



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

“ESTUDIO DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE UN SUELO CONTAMINADO CON DESECHOS DERIVADOS DE LA EXPLOTACIÓN PETROLERA Y DE UNO NO INTERVENIDO”

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar por el grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: DORIS CARMEN MORENO MORENO

DIRECTOR: PhD. GERARDO EMILIO MEDINA RAMÍREZ

Riobamba-Ecuador

2019

©2019, Doris Carmen Moreno Moreno

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El proyecto de investigación: **“ESTUDIO DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE UN SUELO CONTAMINADO CON DESECHOS DERIVADOS DE LA EXPLOTACIÓN PETROLERA Y DE UNO NO INTERVENIDO”**, de responsabilidad de la señorita Doris Carmen Moreno Moreno, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

Dr. Gerardo Emilio Medina Ramírez

DIRECTOR DEL TRABAJO DE

TITULACIÓN

Ing. Ana Rafaela Pacurucu Reyes

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Doris Carmen Moreno Moreno, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este trabajo de titulación, y el patrimonio intelectual del mismo pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos del presente trabajo de titulación.

Doris Carmen Moreno Moreno

C.I 220012851-6

DEDICATORIA

Para la mujer más admirable, valiente y bondadosa que Dios me regaló, mi madre. A su entrega y amor incondicional que han inspirado en mí el deseo de superación durante toda esta etapa de formación profesional.

Para mis hermanos y hermanas; a su ejemplo de trabajo, constancia y dedicación que me han enseñado a perseguir y hacer posible cada meta propuesta.

Doris

AGRADECIMIENTOS

Toda mi gratitud principalmente es para Dios, por ser luz en el transcurso de esta etapa de formación profesional haciendo de este sueño una meta hoy realizada.

Para mi madre las palabras no bastan para agradecerle por todo su amor y fortaleza; valores que me han dado el coraje para alcanzar cada meta propuesta.

Con las fuerzas de mi corazón agradezco a mis hermanos, por su confianza y apoyo permanente; ya que sin ellos no hubiera sido posible culminar esta parte importante de mi vida.

A mi familia, de manera especial a mi tía Rosa; el ángel que inspiró en mí el deseo por realizar esta investigación, a su esposo el Sr. Alfonso Ureña; quien muy gentilmente me permitió realizar la toma de muestras utilizadas dentro de este estudio.

A cada uno de mis amigos; por brindarme parte de su tiempo y compañía haciendo de esta etapa estudiantil un momento más grato.

Al Dr. Gerardo Medina; mi agradecimiento infinito por su asesoría, por el valioso soporte académico y técnico impartido durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A la Ing. Rafaela Pacurucu por su colaboración, apoyo y conocimientos profesionales brindados para mejorar la calidad del trabajo realizado.

A Yolanda Buenaño; bioquímica farmacéutica, encargada del laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos; por su amabilidad, paciencia y facilidades brindadas en el desarrollo experimental del presente trabajo.

Doris

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	4
1.1 Antecedentes de la investigación.....	4
1.2 Marco conceptual	5
1.2.1 Contaminación.....	5
1.2.1.1 Clases de contaminación	5
1.2.1.2 Contaminación del suelo.	6
1.2.2 Petróleo.....	7
1.2.2.1 Productos derivados del petróleo	10
1.2.2.2 Desechos derivados del petróleo.....	12
1.2.3 Diversidad microbiana en el suelo.....	13
1.2.3.1 Bacterias.....	13
1.2.3.2 Cultivo de bacterias en el laboratorio.	15
1.2.3.3 Morfología bacteriana.	16
CAPÍTULO II	
2. MARCO METODOLÓGICO.....	18
2.1 Recolección de muestras.....	19
2.1.1 Medición de la temperatura in situ	20

2.2	Obtención de clones bacterianos.	21
2.2.1	Siembra y recuento bacteriológico.	22
2.2.2	Selección y estabilización de aislados bacterianos.	22
2.2.3	Tinción Gram.....	22
2.3	Caracterización bacteriana.....	23
2.3.1	Evaluación del crecimiento de los clones en medio PCA suplementados con petróleo, diésel y tensoactivos.	24
2.3.2	Evaluación del crecimiento de los clones en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con diésel, petróleo, benceno, tolueno y fenol.....	25
 CAPÍTULO III		
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.1	Muestras de suelo.	26
3.1.1	Determinación de la temperatura in situ.	27
3.2	Obtención de aislados bacterianos.....	28
3.2.1	Recuento bacteriológico.	28
3.2.2	Selección de aislados bacterianos.....	29
3.2.3	Estabilización y reaislamiento de clones bacterianos.....	30
3.3	Caracterización bacteriana.....	31
3.3.1	Características microscópicas.....	32
3.3.2	Evaluación del crecimiento de los clones en medio PCA suplementado con diésel. ...	34
3.3.3	Evaluación del crecimiento de los clones en medio PCA suplementado con petróleo.	39
3.3.4	Comparación de clones del suelo contaminado y del suelo no intervenido tolerantes a diésel y petróleo con crecimiento significativo.	44
3.3.5	Evaluación del crecimiento de los clones en medio PCA suplementado con tensoactivos: Amonio Cuaternario (AC) y Acido Sulfónico lineal (ASL).	45
3.3.6	Evaluación del crecimiento de los clones en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con diésel.....	48
3.3.7	Evaluación del crecimiento de los clones en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con petróleo.	50
3.3.8	Evaluación del crecimiento de los clones en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con benceno.....	52

3.3.9	Evaluación del crecimiento de los clones en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con tolueno.	54
3.3.10	Evaluación del crecimiento de los clones en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con fenol.	56
	CONCLUSIONES.	60
	RECOMENDACIONES.	61
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Clases de contaminación.....	5
Tabla 2-1:	Tipos de suelo de acuerdo a la clasificación americana.....	6
Tabla 3-1:	Contenido de hidrocarburos en combustibles	12
Tabla 4-1:	Clasificación de las bacterias	14
Tabla 5-1:	Morfología Bacteriana	17
Tabla 1-2:	Identificación de las muestras de suelo.....	20
Tabla 2-2:	Composición de Plate Count Agar (PCA)	24
Tabla 3-2:	Composición de Bushnell-Haas	24
Tabla 1-3:	Determinación de la temperatura de cada muestra de suelo	27
Tabla 2-3:	Conteo microbiano inicial a las 48 horas	29
Tabla 3-3:	Bacterias seleccionadas de cada muestra de suelo.....	30
Tabla 4-3:	Bacterias estabilizadas de cada muestra de suelo	30
Tabla 5-3:	Características microscópicas de los aislados bacterianos.....	32
Tabla: 6-3:	Diferencia entre las características de la tinción de Gram de los clones aislados del suelo contaminado y no contaminado	34
Tabla 7-3:	Evaluación del crecimiento de los clones bacterianos en medio PCA suplementado con concentraciones crecientes de diésel (0,25-0,5-1-2-4 % v/v). 35	
Tabla 8-3:	Evaluación del crecimiento de los clones bacterianos en medio PCA suplementado con concentraciones crecientes de petróleo (0,1-0,25-0,5-1-2-4 %v/v).....	40
Tabla 9-3:	Evaluación del crecimiento de los clones bacterianos en medio PCA suplementado con tensoactivos: Amonio cuaternario (500 ppm) y ácido sulfónico lineal (1000 ppm).....	46
Tabla 10-3:	Evaluación del crecimiento de los clones en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con diésel como única fuente de carbono	48
Tabla11-3:	Evaluación del crecimiento de los clones en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con petróleo como única fuente de carbono	51
Tabla 12-3:	Evaluación del crecimiento de los clones en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con benceno como única fuente de carbono	52
Tabla 13-3:	Evaluación del crecimiento de los clones en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con tolueno como única fuente de carbono.....	54
Tabla 14-3:	Evaluación del crecimiento de los clones en medio mínimo Bushnell-Haas suplementado con fenol como única fuente de carbono	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Estructura química de los principales grupos de hidrocarburos presentes en el petróleo	8
Figura 2-1:	Estructura química de los principales constituyentes polares del petróleo	9
Figura 3-1:	Torre de destilación de petróleo.....	11
Figura 1-2:	Protocolo del proceso de la investigación.....	18
Figura 2-2:	Ubicación geográfica de la piscina de desechos petroleros	19
Figura3-2:	Medición de la temperatura in situ en el punto 8 sobre la piscina de desechos petroleros.....	21
Figura 1-3:	Mapa de los puntos de muestreo sobre la piscina de desechos de petróleo	26
Figura 2-3:	Clones seleccionados de las muestras de suelo.....	31
Figura 3-3:	Aspecto del crecimiento de los clones (grupo 2) en medio Bushnell-Haas suplementado con diésel	50
Figura 4-3:	Aspecto del crecimiento de los clones (grupo 2) en medio Bushnell-Haas suplementado con benceno	53
Figura 5-3:	Crecimiento de los clones (grupo 2) en medio Bushnell-Haas suplementado con tolueno	55
Figura 6-3:	Crecimiento de los clones (grupo 2) en medio Bushnell-Haas suplementado con fenol.	57

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-3:** Intensidad de crecimiento de los clones seleccionados en medio PCA suplementado con concentraciones crecientes de diésel (0,25-0,5-1-2-4 % v/v). A: Clones provenientes del suelo contaminado entre 0-30 cm de profundidad (SC1), B: Clones provenientes del suelo contaminado entre 30-60 cm de profundidad (SC2)..... 37
- Gráfico 2-3:** Intensidad de crecimiento de los clones seleccionados en medio PCA suplementado con concentraciones crecientes de diésel (0,25-0,5-1-2-4 % v/v). A: Clones provenientes del suelo diferente contaminado entre 0-30 cm de profundidad (SDC1), B y C: Clones provenientes del suelo diferente contaminado entre 30-60 cm de profundidad (SDC2)..... 38
- Gráfico 3-3:** Intensidad de crecimiento de los clones seleccionados en medio PCA suplementado con concentraciones crecientes de diésel (0,25-0,5-1-2-4 % v/v). A: Clones provenientes del suelo no contaminado entre 0-30 cm de profundidad (SNC1), B: Clones provenientes del suelo no contaminado entre 30-60 cm de profundidad (SNC2)..... 39
- Gráfico 4-3:** Intensidad de crecimiento de los clones seleccionados en medio PCA suplementado con concentraciones crecientes de petróleo (0,1-0,25-0,5-1-2-4 % v/v). A: Clones provenientes del suelo contaminado entre 0-30 cm de profundidad (SC1), B: Clones provenientes del suelo contaminado entre 30-60 cm de profundidad (SC2) 42
- Gráfico 5-3:** Intensidad de crecimiento de los clones seleccionados en medio PCA suplementado con concentraciones crecientes de petróleo (0,1-0,25-0,5-1-2-4 % v/v). A: Clones provenientes del suelo diferente contaminado entre 0-30 cm de profundidad (SDC1). B y C: Clones provenientes del suelo diferente contaminado entre 30-60 cm de profundidad (SDC2)..... 43
- Gráfico 6-3:** Intensidad de crecimiento de los clones seleccionados en medio PCA suplementado con concentraciones crecientes de petróleo (0,1-0,25-0,5-1-2-4 % v/v). A: Clones provenientes del suelo no contaminado entre 0-30 cm de profundidad (SNC1), B: Clones provenientes del suelo no contaminado entre 30-60 cm de profundidad (SNC2),..... 44
- Gráfico 7-3:** Crecimiento de los clones superior o igual a tres en medio PCA suplementado con diésel y petróleo (4 % v/v)..... 45

Gráfico 8-3:	Crecimiento de los clones en medio PCA suplementado con tensoactivos: Amonio cuaternario (500 ppm) y ácido sulfónico lineal (1000 ppm). A: clones provenientes de la muestra SDC1, B: clones provenientes de la muestra SDC2, C: clones provenientes de la muestra SNC1	47
Gráfico 9-3:	Clones con crecimiento 2 y 3 tolerantes a ASL y AC de cada muestra de suelo	48
Gráfico 10-3:	Número de clones del suelo contaminado y del suelo no contaminado en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con: diésel, petróleo, benceno, tolueno y fenol como única fuente de carbono.....	58

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo A:** Recolección de muestras.0
- Anexo B:** Proceso de siembra y estimación de unidades formadores de colonias de las muestras.
- Anexo C:** Selección de aislados bacterianos
- Anexo D:** Micromorfología de los clones bacterianos seleccionados
- Anexo E:** Evaluación de la tolerancia de los clones a concentraciones crecientes de diésel
- Anexo F:** Evaluación de la tolerancia de los clones a concentraciones crecientes de petróleo
- Anexo G:** Crecimiento de los clones en medio mínimo Bushnell-Haas suplementado con diésel
- Anexo H:** Crecimiento de los clones en medio mínimo Bushnell-Haas suplementado con petróleo
- Anexo I:** Crecimiento de los clones en medio mínimo Bushnell-Haas suplementado con benceno
- Anexo J:** Crecimiento de los clones en medio mínimo Bushnell-Haas suplementado con tolueno
- Anexo K:** Crecimiento de los clones en medio mínimo Bushnell-Haas suplementado con fenol.

RESUMEN

La presión metabólica generada sobre la población bacteriana de un suelo contaminado con petróleo durante largos periodos de tiempo; es ideal para la búsqueda de bacterias con capacidad de degradar hidrocarburos, importantes en procesos de biorremediación. El objetivo de esta investigación fue estudiar la flora bacteriana aislada de un suelo contaminado con desechos petroleros y la de un suelo no intervenido. Para esto se realizó un aislamiento bacteriano a partir de seis muestras de suelo utilizando medio PCA con y sin diésel, de este aislamiento se seleccionaron 57 clones sobre los cuales se realizaron pruebas para evaluar la tolerancia a diésel, petróleo (0,1 %, 0,25 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 4 % v/v) y tensoactivos (1 % v/v), además se realizaron pruebas para determinar la capacidad de crecimiento de estos clones en medio Bushnell-Haas utilizando como única fuente de carbono: diésel, petróleo, benceno, tolueno y fenol (1 % v/v). Las pruebas de tolerancia mostraron que existe mayor número de clones tolerantes a diésel que a petróleo, para el caso del petróleo la tolerancia fue similar para los clones aislados a partir de los dos tipos de suelo, mientras que para el caso del petróleo, la mayoría de los clones tolerantes se obtuvieron a partir del suelo no intervenido. Con respecto a los tensoactivos, la mayoría de los clones tolerantes a ácido sulfónico lineal se obtuvieron a partir del suelo no intervenido, mientras que para el amonio cuaternario, la tolerancia es similar para los clones aislados del suelo contaminado y no contaminado. El clon 17 aislado del suelo contaminado presentó en tres repiques sucesivos sobre las diferentes presiones selectivas como única fuente de carbono, un crecimiento superior al resto. Se recomienda el uso de los clones que presentaron mayor crecimiento, en consorcios para procesos de biorremediación en zonas impactadas con petróleo y sus derivados.

Palabras clave: <BIOTECNOLOGÍA>, <MICROBIOLOGÍA>, <MICROBIOTA NATIVA>, <PETRÓLEO>, <PISCINA DE DESECHOS PETROLEROS>, <TOLERANCIA A HIDROCARBUROS>, <METABOLISMO>

ABSTRACT

The metabolic pressure generated on the bacterial population in a contaminated soil with petroleum for long periods of time; It is ideal for the search of bacteria capable of degrading hydrocarbons, important in bioremediation processes. The objective of this research was to study the bacterial flora isolated from a contaminated soil with petroleum residues and a soil not intervened. A bacterial isolation was made from six soil samples using medium "PCA" with and without diesel, based on this isolation, 57 clones were selected, these tests were carried out to evaluate the tolerance to diesel, petroleum (0.1%, 25%, 0.5%, 1%, 2%, 4% v/v) and surfactants (1% v/v), in addition tests were carried out in order to determine the growth capacity of these clones in Bushnell-Haas medium using as unique carbon source: diesel, petroleum, benzene, toluene and phenol (1% v / v). Tolerance tests showed that there are more diesel-tolerant clones than petroleum, for the petroleum case the tolerance was similar for the clones isolated from the two types of soil, while in the petroleum case, most of the tolerant clones were obtained from the soil which was not intervened. With respect to the tensactives, most of the tolerant clones to linear sulfonic acid were obtained from the soil not intervened, while, for the quaternary ammonium, the tolerance was similar for the clones isolated from the contaminated and uncontaminated soil. The clone 17 isolated from the contaminated soil presented in three successive peaks on the different selective pressures as the sole carbon source, as a result with a superior growth to the rest. It is recommended the use of the clones that showed the highest growth, in consortiums for bioremediation processes in impacted areas with petroleum and its derivatives.

Keywords: <BIOTECHNOLOGY>, <MICROBIOLOGY>, <NATIVE MICROBIOTIC>, PETROLEUM, <PETROLEUM WASTE POOL>, HYDROCARBON TOLERANCE>, <METABOLISM>

INTRODUCCIÓN

Formulación del problema.

La actividad petrolera produce severas alteraciones en los ecosistemas, tanto en sus componentes bióticos como abióticos, lo que implica cambios en la comunidad de seres vivos: vegetación, fauna, microorganismos y afectación a los procesos ecológicos (Báez, 2013, pp. 2-3).

De 1964 a 1990, la empresa transnacional Texaco operó en el Ecuador (Amazonía noroccidental) utilizando técnicas obsoletas, perforó y operó 356 pozos de petróleo y abrió 1.000 fosas sin ningún tipo de recubrimiento donde arrojó residuos de todo tipo, principalmente petróleo, lodos de perforación y aguas tóxicas, que causaron importantes daños ambientales (Ministerio de Relaciones Exteriores y Movilidad Humana, 2015, pp. 1-5).

Según la Red de resistencia a las actividades petroleras en los países tropicales (Oilwatch, por sus siglas en inglés), muchos de estos lodos permanecen aún en piscinas donde llevan más de veinticinco años; se calcula que 80.000 toneladas de residuos petroleros están esparcidos por la Amazonía (Funes & Pérez, 2016, p. 60).

Uno de los sitios afectados por la contaminación petrolera que causó la empresa transnacional estadounidense Texaco es la parroquia rural de San Carlos, ubicada en la provincia de Orellana donde se encuentra el campo Sacha, uno de los más grandes campos petroleros de Ecuador descubierto en 1969 por dicha empresa (Cazorla & Gartor, 2015).

En 1995 a modo de “remediación” la empresa disimuló centenares de piscinas de residuos tóxicos, producto de las actividades extractivas, cubriéndolas con una capa de “materia orgánica” y dejándolas en el mismo estado de contaminación (Ministerio de Relaciones Exteriores y Movilidad Humana, 2015, p. 5).

Desde el punto de vista microbiano, la presencia de petróleo en el suelo, induce la selectividad y disminuye la diversidad de microorganismos ya que este ambiente contaminado genera un estrés que permite que algunos microorganismos desarrollen y utilicen respuestas enzimáticas y fisiológicas especializadas (Atlas et al., 1991; citado en (Rivera et al, 2002, p. 423). La búsqueda y evaluación de los microorganismos que utilizan hidrocarburos derivados del petróleo como fuente de carbono y/o energía, es prioritaria para desarrollar nuevas tecnologías de biorremediación en ambientes expuestos a concentraciones tóxicas de petróleo y otros contaminantes.

Justificación del problema.

Actualmente el petróleo es la fuente de energía más importante y la materia prima en diversos procesos de la industria química (Pacheco, et al., s.f.), sin embargo, también se caracteriza por ser una matriz contaminante que contiene una elevada diversidad de compuestos, ideal para evaluar el potencial catabólico de cepas o consorcios microbianos de interés en biorremediación (Torres, 2009, p. 23).

Las comunidades microbiológicas del suelo son alteradas por la contaminación petrolera dándose una profunda transformación en ellas, por una parte altera su composición, desapareciendo o disminuyendo las especies más vulnerables, y por otra, las poblaciones tolerantes sobreviven ante la presencia de estos contaminantes (Bravo, 2007, p. 46) despertando en ellas una reacción a nivel metabólico y genético, como resultado en estas comunidades la diversidad puede estar influenciada por los tipos de compuestos presentes y por el tiempo que las poblaciones han estado expuestas a ellos, induciendo que estas sean menos diversas que aquellas de referencia no contaminados (Valderrama, 2000).

Los estudios sobre el impacto de los desechos de petróleo en comunidades microbianas, muestran una posibilidad real para el uso de bacterias en procesos de biorremediación ambiental o a su vez enriquecer los métodos tradicionales mediante la implementación de nuevas tecnologías cuyo fin permita acelerar o mejorar dichos procesos.

La presente investigación tiene como objetivo principal el estudio comparativo de la microbiota aislada de muestras de suelo contaminado con desechos derivados de la explotación petrolera (piscina de desechos) y de un suelo no intervenido. Para ello; sobre los clones aislados se evaluará el efecto de compuestos derivados del petróleo (diésel, petróleo, benceno, tolueno y fenol)

Se procede a realizar esta investigación con el fin de generar información, proponer soluciones innovadoras y promover el interés del hombre sobre el aislamiento y estudio de nuevas especies microbianas con potencial degradador que podrían ser utilizadas para la remediación de ecosistemas afectados en la amazonia ecuatoriana.

De acuerdo con las líneas de investigación de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo esta investigación es pertinente con la carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental.

Objetivos.

Objetivo general.

Estudiar la flora bacteriana aislada de un suelo contaminado con desechos petroleros y la de un suelo no intervenido.

Objetivos específicos.

- Aislar y caracterizar la flora bacteriana nativa a partir de un suelo contaminado con residuos petroleros y de un ambiente no intervenido de la Parroquia San Carlos.
- Evaluar el efecto de diferentes presiones selectivas sobre el crecimiento de los microorganismos aislados.
- Conocer el efecto de la contaminación con desechos derivados de la explotación petrolera según la carga microbiana en una piscina de desechos.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Antecedentes de la investigación

Uno de los principales problemas derivado de la explotación petrolera es la contaminación de suelo, agua y aire, por lo cual se han desarrollado estudios para realizar de forma más eficiente la descontaminación, siendo una de las tecnologías más aplicadas; la biorremediación (Pérez, et al., 2015, p. 21). El cultivo de microorganismos en laboratorios es importante para poder evaluar su posible papel en el funcionamiento de los ecosistemas. Los estudios ya realizados sobre la diversidad microbiana ayudan a diseñar experimentos para aislar nuevos microorganismos (Nogales, 2005, p. 7).

En el año 2002, Rivera realizó un estudio para evaluar capacidad de adaptación y crecimiento de 34 cepas seleccionadas a partir de núcleos rizosféricos de pastos en suelos contaminados con petróleo (recientes y crónicos) y no contaminados, para lo cual mediante tres fases sucesivas en medios sólidos y líquidos con petróleo como única fuente de carbono y energía, determinó que la mayoría de las bacterias tolerantes a petróleo se obtienen a partir de la rizósfera del pasto establecido en Gleysol fuertemente contaminado (Rivera et al, 2002, pp. 425-433).

En Long Beach (California) se aislaron microorganismos de suelos contaminados con diésel que posteriormente se aplicaron a procesos de biorremediación, durante el estudio encontraron consorcios bacterianos degradadores de hidrocarburos identificados por secuenciación de genes 16S-RNA, demostrando la presencia de *Bacillus cereus*, *Bacillusphaericus*, *Bacillusfusiformis*, *Bacilluspumilis*, *Acinetobacterjunii*, y *Pseudomonassp* (Benavides et al, 2006, p. 86).

Tanto Nisperuza como Montiel, en el año 2010 realizaron un estudio con el fin de conocer cuáles son las cepas bacterianas nativas de un suelo perteneciente a un pozo petrolero del corregimiento de San Sebastián, Lorica, y evaluar la eficiencia de su capacidad hidrocarburohídrica, mencionando que solo aquellos microorganismos capaces de descomponer hidrocarburos serán capaces de crecer en medio mínimo (Bushnell Haas) suplementado con petróleo estéril como única fuente de carbono y energía (Nisperuza, et al., 2010).

1.2 Marco conceptual

1.2.1 Contaminación

Se denomina contaminación a la incorporación natural o antropogénica de un agente físico, químico o biológico que altere el equilibrio ecológico de un ecosistema: el aire, los suelos y el agua; estos agentes pueden estar en estado sólido, líquido o gaseoso o una mezcla de ellos (Bermúdez, 2010, p. 5) y (Peñaloza, 2012)

La contaminación de origen natural, por ejemplo en el caso de erupciones volcánicas y la erosión generalmente nunca es tan grave como la de origen antropogénico, por ejemplo, las actividades productivas como la explotación de recursos no renovables como el petróleo o minerales, la industria en general o la agricultura. Sin embargo las actividades no productivas como las realizadas dentro del hogar o las asociadas con el transporte también pueden causar contaminación (Albert, 2004, pp. 39-40).

1.2.1.1 Clases de contaminación

La contaminación ambiental se puede clasificar de diferentes formas: por el proceso que la causa, por el tipo y origen del contaminante, por sus efectos y por el sustrato afectado (Albert, 2004, pp. 41-45) (Tabla1-1)

Tabla 1-1: Clases de contaminación

CLASES	SUBCLASE
Por el proceso que la causa	Natural
	Antropogénico
Por el tipo de contaminante	Biológicos
	Químicos
	Físicos
Por el origen de los contaminantes	Natural
	Artificial (xenobiótico)
Por la naturaleza química del contaminante	Orgánicos
	Inorgánicos
Por sus efectos	Tóxicos
	Adversos

Por el recurso afectado	Contaminación del agua
	Contaminación del aire
	Contaminación del suelo

Fuente: (Albert, 2004, pp. 41-45)

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

1.2.1.2 Contaminación del suelo.

EL suelo es un recurso natural situado en la parte exterior de la corteza terrestre; espacio íntimamente vinculado con la vida y con las actividades del hombre. Esta constituido de arena, arcilla, limo y materia orgánica (humus) en proporciones variables que definen los tipos de suelo (Tabla 2-1) (Atilio, 2007, pp. 15-17)

Tabla 2-1: Tipos de suelo de acuerdo a la clasificación americana

TIPO DE SUELO	RELACIÓN Arena-limo-arcilla (%)	SÍMBOLO
Arenoso	90-5-5	a
Arenoso franco	80-15-5	aF
Franco arenoso	65-25-10	Fa
Franco	40-40-20	F
Franco limoso	20-65-15	FL
Franco arcilloso arenoso	35-35-30	FAa
Franco arcilloso	35-30-35	FA
Franco arcilloso limoso	10-35-55	FAL
Limoso	10-85-5	L
Arcilloso arenoso	55-5-40	Aa
Arcilloso limoso	5-50-45	AL
Arcilloso	10-20-60	A

Fuente: (Atilio, 2007, p. 17)

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

“La contaminación del suelo es el desequilibrio físico, químico o biológico que afecta negativamente plantas, animales y humanos, debido principalmente al inadecuado manejo de residuos sólidos y líquidos” (Bolaños, 2011 citado en: Peñaloza, 2012, p. 3), este fenómeno se ve potenciado por las actividades industriales y la generación de sustancias químicas que son desechadas al suelo (Benavides et al, 2006, p. 18).

Dentro de las actividades agrícolas, los pesticidas son las sustancias contaminantes más comunes, así también el petróleo que se deriva de la industria petrolera debido a la necesidad del hombre por producir combustibles (Benavides et al, 2006, p. 18) además es importante mencionar que los compuestos asociados como solventes que se filtran a través del suelo y los sólidos y grasas que permanecen en la superficie (Bravo, 2007, p. 19).

1.2.2 Petróleo.

El petróleo es un líquido viscoso de color oscuro, formado por la degradación anaeróbica de materia orgánica durante largos períodos de tiempo bajo condiciones de alta temperatura y presión (Vargas et al, 2004, p. 4).

Los hidrocarburos son los compuestos orgánicos más abundantes en el petróleo, siendo el carbono el elemento con mayor proporción; entre 80-87%, seguido por el hidrógeno con una proporción entre 10-15%, adicionalmente, el azufre que representa una proporción entre 0-10%, nitrógeno entre 0-1% y finalmente el oxígeno entre 0- 5%, todos ellos presentes en su forma elemental o como constituyentes heterocíclicos y grupos funcionales. Se reportan también algunos metales traza como Vanadio, Níquel, Hierro, Aluminio y Cobre, cuya concentración varía dependiendo del tipo de petróleo crudo y la región en donde se formó (Botello et al, 2005, p. 265).

Entre los principales componentes del petróleo están los siguientes:

-Hidrocarburos saturados de cadena lineal (alcanos).

-Hidrocarburos acíclicos (cicloalcanos)

-Hidrocarburos aromáticos como benceno, tolueno y xileno (Figura 1-1)

-Compuestos polares como: a) compuestos con azufre; b) compuestos con nitrógeno; c) porfirinas d) compuestos con oxígeno; e) asfaltenos y f) metales pesados. Dentro de los compuestos de oxígeno están los alcoholes (fenol), esterés, éteres, cetonas, furanos, ácidos carboxílicos (Figura 2-1) (Botello et al, 2005, p. 265)

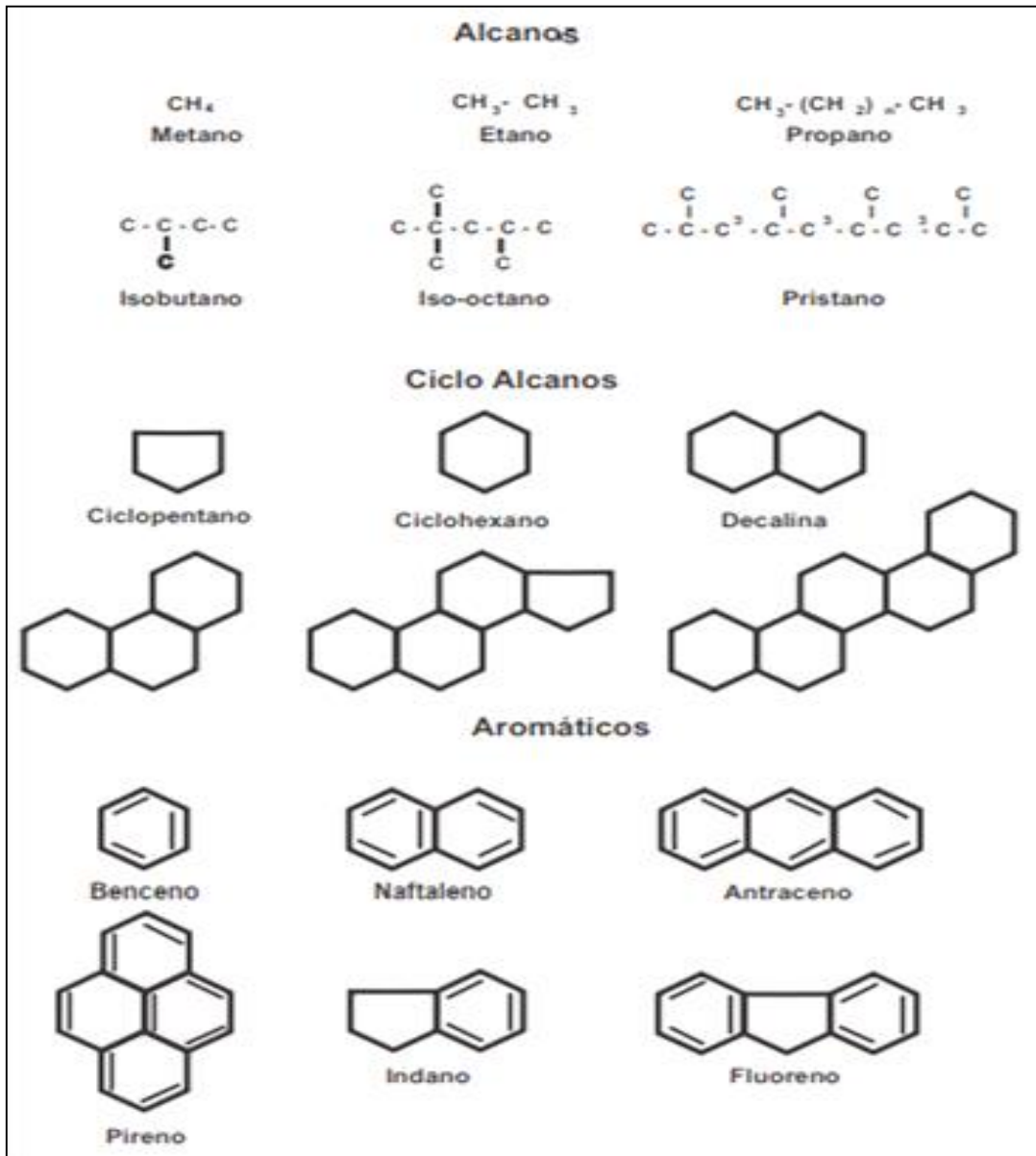


Figura 1-1: Estructura química de los principales grupos de hidrocarburos presentes en el petróleo

Fuente:(Botello et al, 2005, p. 264)

Realizado por: Moreno, Doris; 2019.

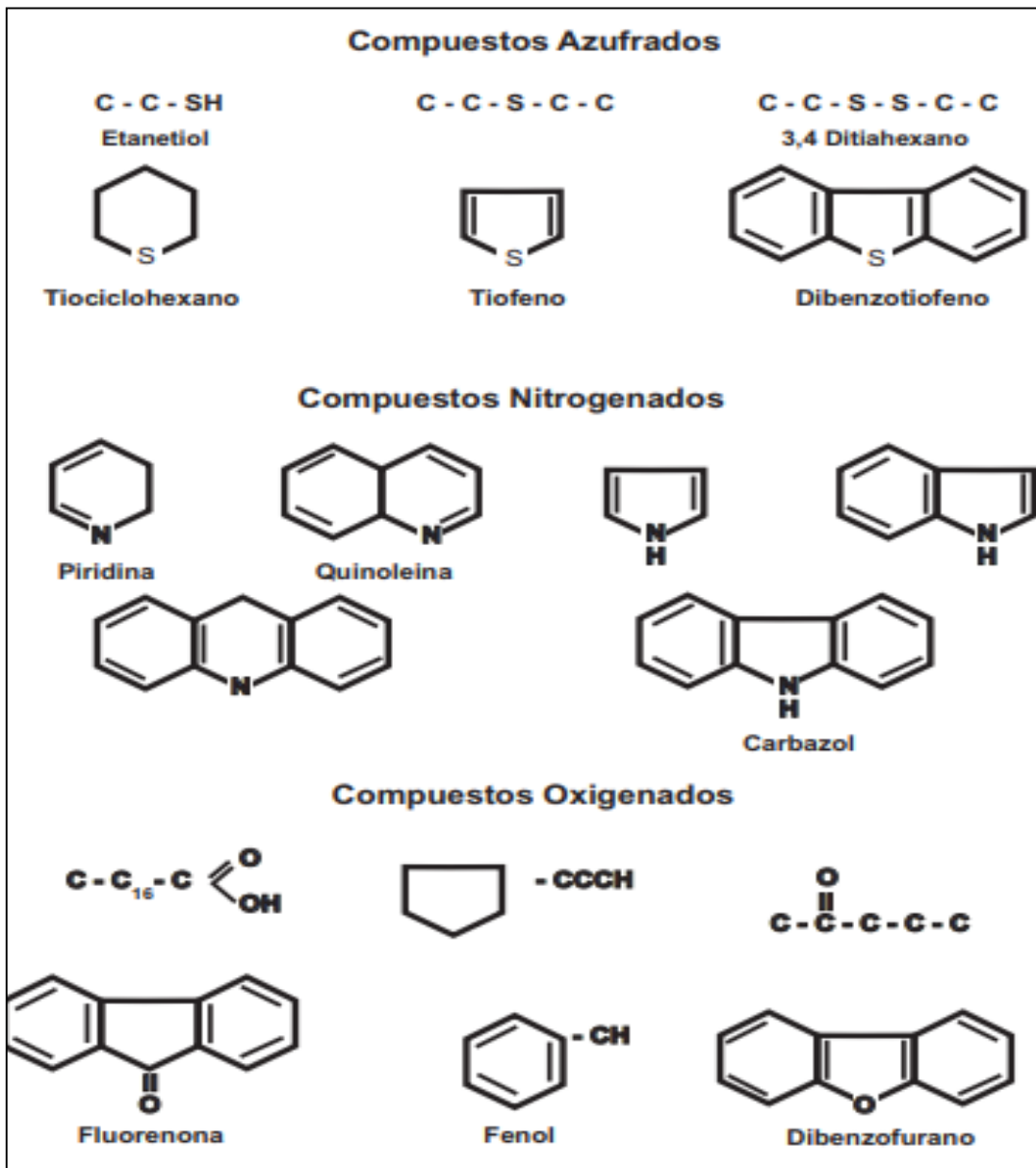


Figura 2-1: Estructura química de los principales constituyentes polares del petróleo

Fuente:(Botello et al, 2005, p. 265)

Realizado por: Moreno, Doris; 2019.

El benceno posee una fórmula molecular C_6H_6 , es el hidrocarburo aromático más conocido y mejor estudiado, comprende aproximadamente el 20 % de la composición total del petróleo crudo; siendo este el más abundante, es relativamente soluble en agua y se encuentra entre los hidrocarburos aromáticos más tóxicos (Botello et al, 2005, p. 267)

El Tolueno cuya fórmula molecular es C_6H_8 se encuentra de forma natural en el petróleo crudo, es un líquido incoloro de olor característico, poco soluble en agua por lo que se separa de esta y

asciende gracias a su menor densidad, es bastante nocivo y muy tóxico, aunque no más que el benceno.

La fórmula química del fenol es C_6H_5OH , no se considera un alcohol, ya que su grupo funcional es $pH-OH$ y no como los alcoholes que es $R-OH$. A temperatura ambiente, el fenol se evapora más lentamente que el agua, es soluble en Alcohol, Glicerol, petróleo y una cantidad moderada del mismo puede solubilizarse con agua; a temperaturas por encima de $68^{\circ}C$, el fenol es completamente soluble en agua. El producto comercial es una solución de Fenol en agua, densa y almibarada (Botello et al, 2005, p. 267).

1.2.2.1 Productos derivados del petróleo

El petróleo crudo, a través de varios procesos en una refinería; experimenta cambios físicos y químicos, mediante la destilación fraccionada realizada en una torre de destilación; el proceso se basa en la separación de cada componente del petróleo crudo según su punto de ebullición (Figura 3-1); mientras mayor sea el punto de ebullición mayor es el peso de este compuesto (Ministerio de energía, 3013).

Los combustibles son los principales componentes que se derivan del petróleo, por ejemplo el gas licuado de petróleo (GLP) utilizado como “combustible doméstico e industrial”, las gasolinas de motor corriente y de aviación, el kerosén que “se utiliza en estufas domésticas y en equipos industriales”, el diésel de uso común en vehículos y los combustóleos o Fuel Oil que es un “combustible pesado para hornos y calderas industriales”(CONUEE, 2017, pp. 1-4).

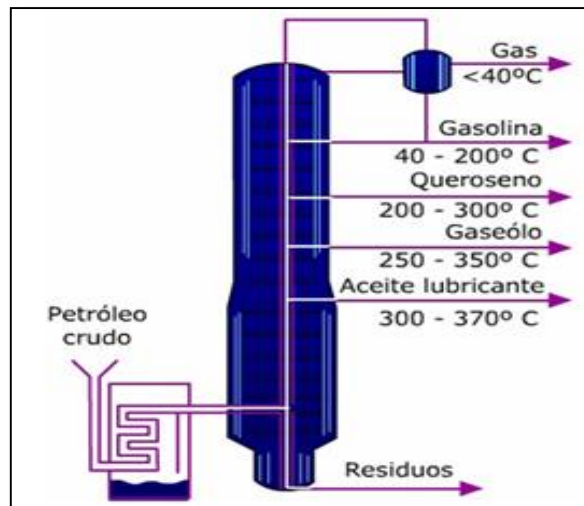


Figura 3-1: Torre de destilación de petróleo.

Fuente:(Ministerio de energía, 3013)

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

En el suelo o en el agua los combustibles son indicadores de contaminación considerando que estos contienen hidrocarburos, entre los cuales se pueden citar por ejemplo los compuestos aromáticos mono y polinucleares que por naturaleza son los más tóxicos (Lesser & Susana, 2001, pp. 2-4).

La gasolina y el diésel tienen como componentes: benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX) y naftaleno, estos hidrocarburos generan contaminación cuando se desechan al ambiente. En la gasolina los BTEX se encuentran en mayor proporción que el diésel, mientras que el naftaleno se encuentra en proporciones similares (Tabla 3-1), otros hidrocarburos poliaromáticos presentes en el diésel son: antraceno, fenantreno, fluoranteno, acenafteno, fluoreno y pireno (Lesser & Susana, 2001, pp. 3-4).

Tabla 3-1: Contenido de hidrocarburos en combustibles

Compuesto	Gasolina (%)	Diésel (%)
Benceno	0.12 - 3.50	0.50
Tolueno	2.73 - 21.80	1.33
Etilbenceno	0.36 - 2.86	0.37
<i>o</i> -xileno	0.68 - 2.86	1.01
<i>m</i> -xileno	1.77 - 3.87	0.96
<i>p</i> -xileno	0.77 - 1.58	0.35
Naftaleno	0.09 - 0.49	0.50

Fuente:(Lesser & Susana, 2001, p. 9)

Realizado por: Moreno, Doris; 2019.

El diésel, también conocido como gasóleo o gasoil, es un compuesto hidrocarburífero el cual posee cadenas hidrocarbonadas entre 10 y 20 carbonos, el diésel de tipo A es el adecuado para los vehículos ya que es más refinado y contiene aditivos para evitar la solidificación de la parafina a bajas temperaturas, por su baja concentración de BTEX; el diésel es más denso, menos volátil y soluble, y por ende menos móvil que la gasolina (CONUEE, 2017, pp. 1-4)

1.2.2.2 Desechos derivados del petróleo.

El petróleo a pesar de que provee muchos productos para el consumo humano, genera desechos desde que se inicia el proceso de explotación, durante la extracción se genera lodos de perforación, posteriormente el crudo se trata químicamente para separar de él dos elementos no deseados: el gas que es quemado en mecheros y las aguas de producción desechadas a los esteros o ríos, o bien reinyectadas a alguna formación geológica (Beristain et al, 2009, p. 10)

Los fenoles, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y los metales pesados son los principales compuestos presentes en las aguas residuales de refinería. Los fenoles son de gran relevancia debido a que su presencia en el medio representa un riesgo importante para la biota acuática, es un compuesto muy persistente y letal a bajas concentraciones (5 - 25 mg / L), lo que representa un riesgo para la salud humana. La toxicidad del fenol está relacionada con la formación de radicales libres y su hidrofobicidad, la cual afecta la solubilidad del fenol en la fracción celular y, por tanto, la posibilidad de interacción del compuesto con las células (Díaz, et al., 2016, p. 686)

En Ecuador, principalmente en la Amazonia; la problemática de la contaminación crónica surgió con la llegada de la empresa transnacional Texaco debido al desarrollo de las actividades

petroleras (Becerra et al, 2013, pp. 103-104), los desechos tóxicos generados eran descargados sobre presas o piscinas abiertas alrededor de las plataformas de perforación que posteriormente fueron cubiertas con una capa de tierra y por la fuerza de gravedad se mezcló con dichos contaminantes, los valores de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) en estas piscinas están entre 50.000 y 120.000 ppm (Ortínez, et al., 2003, p. 90).

1.2.3 Diversidad microbiana en el suelo.

La diversidad microbiana hace referencia a la variedad de microorganismos en el medio en el que se encuentren, generalmente sobre la tierra los microorganismos son los seres vivos más abundantes, se encuentran colonizando cada nicho ecológico posible, prácticamente están presentes en todas las regiones del planeta; en ambientes con temperatura bajo cero y muy secos hasta lugares donde la temperatura es muy alta y las precipitaciones constantes (Vazques, 2016).

La diversidad de bacterias en el suelo es la causa de la fertilidad del mismo (Portugal & Aguilera, 1998, p. 290). Aunque en los suelos contaminados con hidrocarburos existen más microorganismos que en los suelos no contaminados, su diversidad es más reducida (Pinos, 2008, pp. 28-32).

En los suelos, la diversidad microbiana ha sido poco explorada debido a que gran parte de microorganismos no pueden ser cultivados, no obstante en los estudios para caracterizar esta biodiversidad asume que mediante las técnicas de cultivo se es posible recuperar la mayor parte de los microorganismos, sin embargo, solo el 0,1 y 10 % de las bacterias son realmente cultivables (Rondon et al.,1999; Watts et al.,1999;Tiedje y Stein, 1999; Handelsman et al., 2002; Torsviky, 2002; Torsvik et al.,2002) citados en (Escalante, et al., 2004).

1.2.3.1 Bacterias.

Las bacterias son microorganismos unicelulares sin núcleo que no se pueden observar a simple vista, sin embargo se conoce que son los organismos vivos más numerosos que existen en la tierra, viven en el aire, agua, suelo y en otros organismos. Su importancia, principalmente sobre el suelo; radica en el poder que tienen para transformar sustancias orgánicas en inorgánicas o viceversa; son organismos ecológicos activos capaces de descomponer el petróleo o sus derivados en sustancias que luego pueden utilizar otros microorganismos (Vargas, et al., 2014, p. 2594).

De acuerdo a su necesidad por el oxígeno, las bacterias se pueden clasificar en aerobia, anaerobias y facultativas que son aquellas cuya fuente de vida es el oxígeno pero que sin el también pueden crecer, (Vargas, et al., 2014, p. 2594). Según la temperatura a la que se desarrollan, las bacterias pueden ser: psicrófilas, psicrotrotas, mesófilas y termófilas, mientras que según la necesidad de nutrientes; de forma general, estas pueden ser autótrofas o heterótrofas (Microbiología general, 2017) (Tabla 4-1)

Tabla 4-1: Clasificación de las bacterias

BACTERIA	DESCRIPCIÓN
Por sus necesidades nutricias	
Autótrofas	Se desarrollan en medios de cultivo sencillos compuestos por sales minerales, utilizan CO ₂ como fuente de carbono. Su metabolismo es completo permitiéndoles sintetizar todos los compuestos orgánicos necesarios para su desarrollo y propagación. Poseen importancia en los ciclos biológicos de los elementos son muy importantes en la naturaleza.
Heterótrofas	Necesitan nutrientes más complejos para su desarrollo, difieren enormemente en sus requerimientos de fuentes de carbono, pero estas son siempre compuestos orgánicos. Desde el punto de vista médico es el grupo más importante.
Por la temperatura de desarrollo	
Psicrófilas	La temperatura mínima de crecimiento es - 15°C pero el desarrollo óptimo es entre 10 y 15°C. Su temperatura máxima es de 18-20°C.
Psicrotrotas	Crecen a temperaturas mínimas de -5°C, su desarrollo óptimo es entre 20 y 30°C y la temperatura máxima que resisten es de 35-40°C.
Mesófilas	Tienen temperatura de desarrollo alrededor de los 25 a 42°C, en este grupo se encuentran casi todas las bacterias patógenas.
Termófilas	Tienen temperatura óptima de desarrollo entre los 45°C y a temperatura de 70°C.
Por la necesidad de oxígeno	
Aerobias	Para su desarrollo necesitan la presencia de oxígeno libre
Anaerobias	Solo se desarrollarse en ausencia de oxígeno libre
Facultativas	Generalmente se desarrollan en presencia de oxígeno, aunque viven también sin el

Fuente: (Microbiología general, 2017, pp. 2-4)

Realizado por: Moreno, Doris; 2019.

Generalmente, las bacterias presentan tres formas básicas: las esféricas o cocos, las alargadas o bacilos y las curvadas o espirilos que pueden presentar otras formas como: comas, espiroquetas y vibrios. Algunos cocos por ser achatados se denominan cocobacilos (Vargas, et al., 2014, p. 2594).

El suelo, es uno de los ecosistemas donde se encuentra una gran diversidad de microorganismos, siendo las bacterias los organismos más numerosos (entre 10^6 y 10^7 bacterias g^{-1} de suelo), pudiendo ser algunas benéficas como por ejemplo las *Rizobacterias* que promueven el crecimiento de las Plantas, y otras capaces de generar efectos negativos sobre los organismos, como las patógenas (*Escherichia coli*) capaces de ocasionar enfermedades (Vargas, et al., 2014, p. 2594).

De acuerdo con Montaner (2011, pp. 33-34), las bacterias que normalmente se encuentran en suelos contaminados con petróleo son las *Pseudomonas* particular *Pseudomona. Putida* perteneciente a la subclase proteobacteria. Las comunidades bacterianas capaces de crecer en presencia de petróleo se multiplican y aumenta el número de plásmidos con genes que intervienen en el catabolismo de hidrocarburos. (Leahy y Colwell, 1990 citado en Bravo, 2007, p. 46).

1.2.3.2 Cultivo de bacterias en el laboratorio.

Dada la diversidad bacteriana en la naturaleza, es importante que para su estudio cada especie sea obtenida en forma aislada; es decir, una sola especie de microorganismos (cultivo puro), para lo cual es necesario, como cualquier forma de vida, brindarle a las bacterias los nutrientes necesarios para su crecimiento (medio de cultivo). Para que un cultivo sea considerado puro es necesario esterilizar los medios de cultivo y así eliminar toda forma de vida que no sea de interés para la investigación a realizarse (Rodríguez, et al., 2006, p. 102).

Sin embargo, debido al tamaño reducido de las bacterias; no pueden ser estudiadas como individuos aislados sino como poblaciones, siempre y cuando provengan de una sola célula; para ello es necesario usar medios de cultivo con los nutrientes y cantidades apropiadas a los requerimientos específicos de los microorganismos para los que han sido diseñados (Microbiología general, 2017, p. 5).

Para iniciar un cultivo, se transfiere la muestra a ser estudiada (inoculo) sobre el medio de cultivo previamente estéril; a esta transferencia se le denomina inoculación, de tal forma que se obtendrán microorganismos que posteriormente podrán ser aislados sin otros contaminantes. Cuando los microorganismos crecen sobre medio líquido; este tiende a ponerse turbio, mientras que en medio sólido el crecimiento se nota por la formación de conglomerados bacterianos (colonias) a partir de las cuales se puede obtener un cultivo puro (Rodríguez, et al., 2006, pp. 102-103).

El empleo de medios sólidos es fundamental para lograr separar diferentes tipos de bacterias de una muestra y evaluar la pureza de un cultivo; pues las bacterias al formar colonias pueden ser fácilmente contables y con ello se puede estimar el número total de bacterias en el cultivo original. Uno de los métodos tradicionales para obtener cultivos puros es el método por vaciado en placa, el cual consiste en extender con una espátula una cantidad mínima del inóculo sobre las cajas Petri respectivas con el medio de cultivo, además es importante realizar diluciones seriadas de cada muestra con la finalidad de reducir la cantidad de colonias sobre el medio sólido (Rodríguez, et al., 2006, pp. 103-104).

Los medios para aislar bacterias, en su mayoría son ricos en “proteínas o derivados como proteasas, peptonas, péptidos o aminoácidos, además de carbohidratos y sales minerales” (Rodríguez, et al., 2006, p. 117).

1.2.3.3 Morfología bacteriana.

Las bacterias pueden ser observadas individualmente a través de un microscopio, o a simple vista si estas se encuentran formando colonias cuyos tamaños pueden variar desde 0,5 a 4,0 milímetros (Vargas, et al., 2014, pp. 2594-2597).

La macromorfología se refiere a la forma de las colonias bacterianas; entre otras: el tamaño (en general, las bacterias Gram-positivas producen colonias algo más pequeñas que las Gram-negativas), grado de elevación, borde, color, superficie, densidad, consistencia y olor (Tabla 5-1) (López et al, 2015, p. 35).

La micromorfología se refiere a la forma de las bacterias, es decir, el aspecto de las bacterias (Tabla 5-1) al ser observadas en el microscopio ya sea por observación directa “in vivo” o con una adecuada tinción (método dirigido a incrementar el contraste entre la célula y su entorno, a optimizar el resultado y por lo tanto a mejorar la imagen observada) (Vázquez et al, 2010, pp. 15-16).

La tinción de Gram diferencial, propuesta por el médico danés Christian Gram (1884) es la más utilizada de forma rutinaria y prácticamente la primera prueba a la que se someten las bacterias de cualquier origen antes de su estudio. Proporciona una información esencial sobre el tipo de bacteria de acuerdo a la afinidad tintorial de sus paredes, dividiendo a estas en dos grandes grupos: bacterias con pared de tipo Gram positiva (violeta) y bacterias con pared de tipo Gram negativa (rosa) (Vázquez et al, 2010, pp. 21-22)

Tabla 5-1: Morfología Bacteriana.

MORFOLOGÍA	CLASE	SUBCLASE	DETALLE
Bacterias	Cocos	Diplococos	Después de su división, permanecen en pares
		Tétradas	Agrupación de cocos en una disposición cuadrada
		Sarcinas	Agrupación de cocos con una disposición cúbica
		Estreptococos	Secuencia de cuatro o más células como si se tratase de una cadena
		Estafilococos	Agrupación irregular de cuatro o más cocos, en ocasiones se asemejan a racimos de uvas
	Bacilos	Diplobacilos	bacilos agrupados en pares
		Estreptobacilos	cadena formada por cuatro o más bacilos
		Empalizado	Agrupados lado a lado como palos de fósforo.
		Filamentosas	crecen en forma de fibras y toman distintas disposiciones
	Espirilos	Vibriones	cortos, por lo general presenta la forma de una coma
Espiroquetas		forma helicoidal, pero a diferencia de los espirilos	
Colonias	Color		
	Forma	Circular	Pueden medir hasta 4,0 mm
		Puntiforme	Denominados también en “cabeza de alfiler”
		Irregular	No representan una forma geométrica.
		Rizoide	Presentan una forma helicoidal.
		Fusiforme	En forma de husos.
	Borde	Enteros	Homogéneos en todo su recorrido.
		Ondulados	Presentan pequeñas fenestraciones.
		Lobulados	Sus bordes son curvados de manera irregular.
		Filamentosos	Presentan finos filamentos alrededor de toda la colonia.
	Elevación	Plana	
		Convexa	
		Elevada	
	Textura	Lisas	Superficie homogénea.
		Concéntricas	Su textura se extiende de manera circular, por lo general de afuera hacia adentro.
		Arrugadas	Su superficie presenta pequeñas áreas sobresalientes y leves depresiones
Con curvas		Textura similar a la concéntrica, la diferencia radica en que este presenta un contorno más irregular.	

Fuente: (Vargas, et al., 2014, pp. 2595-2597)

Realizado por: Moreno, Doris; 2019.

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO.

La metodología de este trabajo investigativo se dividió en tres etapas fundamentales: 1) muestreo, 2) obtención de clones bacterianos y 3) caracterización bacteriana. (Figura 1-2).

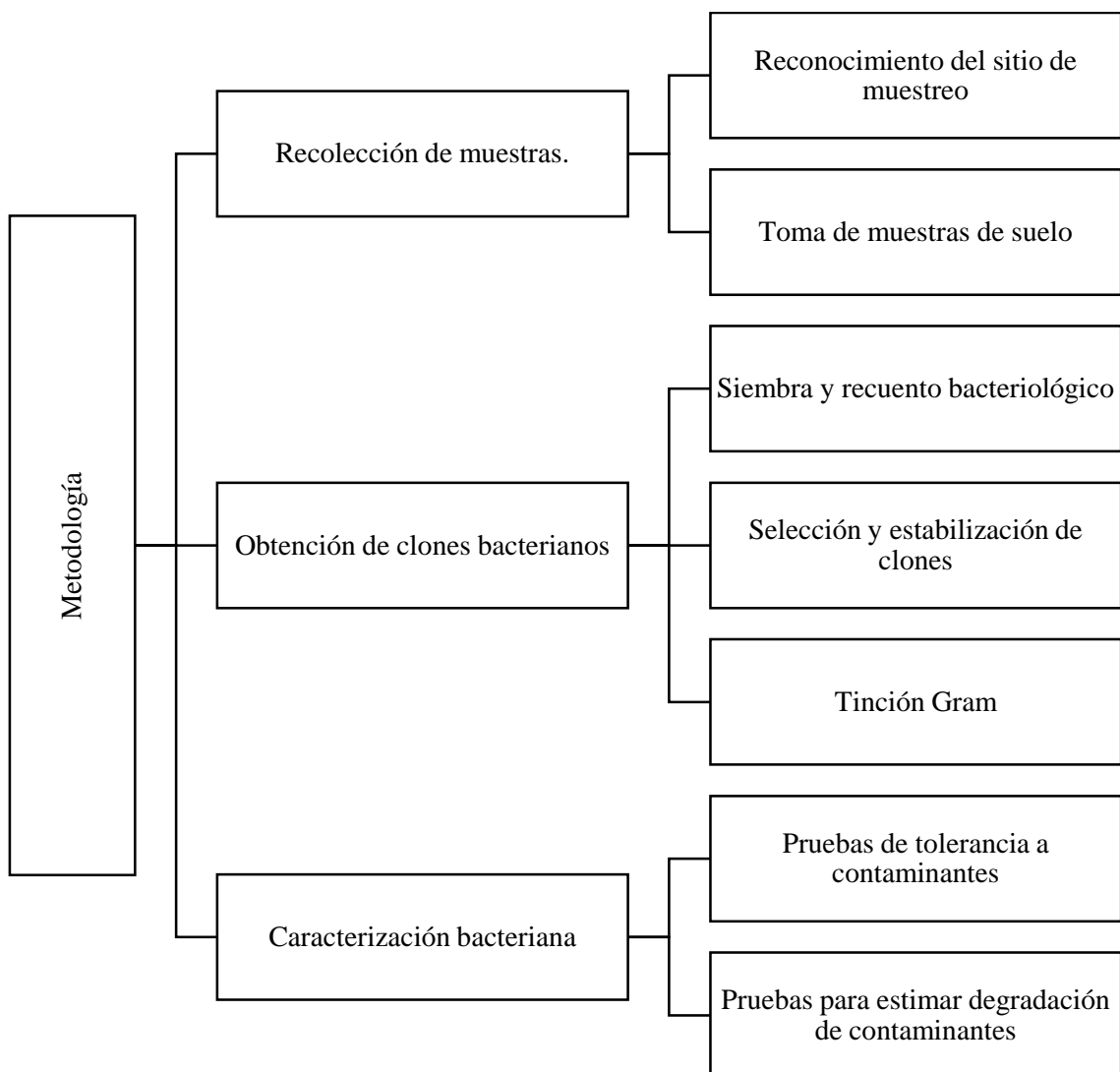


Figura 1-2: Protocolo del proceso de la investigación.

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

2.1 Recolección de muestras.

El muestreo se realizó en un terreno perteneciente al señor Alfonso Ureña, situado en la Parroquia San Carlos, Cantón la Joya de los Sachas, Provincia de Orellana, Ecuador, específicamente en una piscina de desechos de petróleo abierta hace más de 25 años por la empresa transnacional Texaco, cubierta por una capa superficial de tierra sin ningún tipo de tratamiento, el área es de aproximadamente 20 por 30 metros, actualmente en esta área se puede observar una sustancia negra y pastosa al escavar pocos centímetros de profundidad. Además se muestreó en otro terreno ubicado aproximadamente a cincuenta metros de la piscina.



Figura 2-2: Ubicación geográfica de la piscina de desechos petroleros

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

Previo al reconocimiento del lugar se determinaron los puntos de muestreo de los cuales se tomaron submuestras a diferentes profundidades: entre 0-30 y 30-60 centímetros. Se recolectaron seis muestras de suelo etiquetadas como se muestra en la tabla 1-2

De la piscina se tomaron cuatro muestras (dos compuestas y dos simples), para ello; mediante la técnica de cuadrícula se dividió el área en 12 puntos (Figura 1-3) de los cuales se tomaron las submuestras y aplicando el método de cuarteo se obtuvieron dos muestras compuestas denominadas SC1 y SC2 (Tabla 1-2).

Al observar mayor heterogeneidad del punto número 8 de la piscina de desechos (Figura 3-2), se tomaron dos muestras más (SDC1 Y SDC2) (Tabla 1-2) para ser analizadas de forma independiente.

Adicionalmente y de forma aleatoria se escogió un punto ubicado aproximadamente a 50 metros de la piscina del cual se tomaron las muestras SNC1 y SNC2. (Tabla 1-2)

De cada muestra se recolectaron entre 500 y 1000 gramos en frascos de vidrio estériles y previamente etiquetados y se transportaron en un cooler hasta el laboratorio de análisis bioquímicos y bacteriológicos de la facultad de ciencias de la ESPOCH para ser analizados.

Tabla 1-2: Identificación de las muestras de suelo.

MUESTRA	ORIGEN
SC1	Suelo contaminado, muestra compuesta formada por 12 submuestras obtenidas de la piscina de desechos de petróleo a una profundidad entre 0-30 centímetros
SC2	Suelo contaminado, muestra compuesta formada por 12 submuestras obtenidas de la piscina de desechos de petróleo a una profundidad de 30-60 centímetros
SDC1	Suelo del punto número ocho (Figura 1-3) de la piscina de desechos de petróleo, tomado como parte de la muestra SC1 y de manera individual debido a que se muestra diferente del resto por su cobertura vegetal, por su apariencia pastosa y color más oscuro que el resto, tomado entre 0-30 centímetros.
SDC2	Suelo del punto número ocho (Figura 1-3) de la piscina de desechos de petróleo, tomado como parte de la muestra SC2 y de manera individual debido a que se muestra diferente del resto por su cobertura vegetal, por su apariencia pastosa y color más oscuro que el resto, tomado entre 30-60 centímetros.
SNC1	Suelo no intervenido, esta muestra corresponde a un área contigua a la piscina de desechos, sin contaminación visible de crudo y con aspecto natural, recolectado a una profundidad entre 0-30 centímetros
SNC2	Suelo no intervenido, esta muestra corresponde a un área contigua a la piscina de desechos, sin contaminación visible de crudo y con aspecto natural, recolectado a una profundidad entre 30-60 centímetros

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

2.1.1 Medición de la temperatura in situ

Después de haber seleccionado los puntos de muestreo se procedió a tomar la temperatura a distintas profundidades (entre 0 – 30 y 30 – 60 centímetros) con la utilización de un termómetro de mercurio.

En cada punto se realizó un agujero piloto a una profundidad de 15 centímetros aproximadamente, posteriormente se introdujo el termómetro y pasados 2-3 minutos se leyó la temperatura. A continuación se tomó la muestra (0-30 centímetros) para hacer el agujero piloto más profundo hasta 45 centímetros aproximadamente y nuevamente se introdujo el termómetro para una vez transcurridos los 2-3 minutos determinar la temperatura.



Figura 3-2: Medición de la temperatura in situ en el punto 8 sobre la piscina de desechos petroleros.

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

2.2 Obtención de clones bacterianos.

Para el aislamiento de la microbiota a partir de cada muestra de suelo se utilizó medio Plate Count Agar (PCA) cuya composición se detalla en la tabla 2-2, con este medio base se preparó otro medio diferente:

- ✓ Medio PCA sin presión selectiva (grupo1)
- ✓ Medio PCA suplementado con 50 µl de diésel (grupo2)

2.2.1 Siembra y recuento bacteriológico.

De cada muestra se prepararon diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-5} a partir de una solución madre con cinco g de suelo en 50 mL de agua destilada estéril, posteriormente, de las diluciones 10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-5} se tomó 100 μ l y se inocularon sobre placas con el medio de cultivo PCA (grupo 1) y sobre éste suplementado con diésel (grupo 2). Finalmente se distribuyó uniformemente cada dilución con un asa de vidrio estéril en forma de L. La siembra se realizó por duplicado.

La incubación se realizó a 24 grados Celsius (considerando la temperatura ambiente del lugar de muestreo) durante 48 horas. Finalizado el tiempo de incubación se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC) en cada caja y luego se estimó el número de UFC por gramo de suelo.

2.2.2 Selección y estabilización de aislados bacterianos.

Considerando el crecimiento y la macromorfología, se seleccionaron bacterias del grupo 1 y del grupo 2 repicándolas en una nueva caja Petri con el mismo medio del cual fueron aisladas. Posteriormente cada aislado bacteriano fue estabilizado con al menos tres repiques cada 48 horas.

Finalmente para asegurar el crecimiento de un solo tipo de colonia se realizó un reaislamiento por agotamiento mediante la técnica de estriado; para lo cual se utilizó una asa de siembra previamente esterilizada por flameado; esta técnica consistió en tomar parte de la muestra para ser sembrada sobre medio agarizado; realizando movimientos en zig-zag haciendo estrías sin tocarse entre ellas (microbiologiabohio, 2017).

2.2.3 Tinción Gram.

Posterior al reaislamiento se analizó la pureza de las bacterias con la técnica de tinción Gram con el fin de clasificarlas de acuerdo con las propiedades de sus membranas para teñirse. Las bacterias Gram positivas son las que después de la tinción se observan de color azul oscuro o morado, y las bacterias Gram negativas se observan de color rosa a rojo (López et al, 2014, p. 12).

Antes de iniciar la tinción Gram, cada aislado bacteriano proveniente de las muestras de suelo, fue extendido en un porta objetos con una gota de agua destilada para luego ser fijado por calor en la flama del mechero con la finalidad de preservar la arquitectura estructural y química de las

células. Posteriormente se colocó cristal violeta (colorante primario) dejándolo actuar durante 1 minuto, enseguida se lavó con agua destilada para adicionar lugol (1 minuto) lo cual impide la salida del cristal violeta, luego se colocó una mezcla de alcohol-acetona (30 segundos) para deshidratar la pared bacteriana y cerrar los poros de la misma, finalmente se adicionó safranina (colorante secundario utilizado para teñir las bacterias que no pudieron retener el cristal violeta) dejándola actuar por 1 minuto (López et al, 2014, p. 12)

2.3 Caracterización bacteriana.

Las bacterias aisladas y posteriormente seleccionadas en este estudio; se evaluaron para determinar su tolerancia y capacidad de crecimiento en medios sólidos (Plate Count Agar, Bushnell- Haas) suplementados con diferentes presiones selectivas. El crecimiento de cada clon se expresó según su diámetro, para ello se estableció una nomenclatura de “0,1” para diámetros menores a 0,1 cm, “1” para diámetros de 0,1cm, “2” para diámetros de 0,2 cm, “3” para diámetros de 0,3cm, “4” para diámetros de 0,5 cm, “5” para diámetros iguales o mayores a 1 cm y “*” representa a los clones no determinado.

Medios de cultivo.

El medio Plate Count Agar (PCA) se preparó de acuerdo a las especificaciones del fabricante: 23,5 gramos de medio en 1 litro de agua destilada, posteriormente se calentó con agitación frecuente y se llevó a ebullición para disolver completamente el medio, finalmente se autoclavó a 121°C durante 15 minutos para ser distribuido en placas Petri. Se estableció una relación para la preparación del volumen total del medio.

Tabla 2-2: Composición de Plate Count Agar (PCA)

COMPONENTE	CANTIDAD (g/l)
Caseína	5,00
Extracto de levadura	2,50
Glucosa	1,00
Agar	15,00
pH final: 7.0 ± 0.2	

Fuente: (Allaert & Escolá, 2002, p. 156)

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

El medio Bushnell-Haases usado principalmente para estudiar la microbiota presente en hidrocarburos, para su preparación se hizo una relación de acuerdo a los componentes del mismo (Tabla 3-2) y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos para ser distribuido en placas Petri.

Tabla 3-2: Composición de Bushnell-Haas

COMPONENTE	CANTIDAD (g/l)
Sulfato de magnesio	0,20
Cloruro de calcio	0,02
Fosfato mono potásico	1,00
Fosfato de hidrogeno di amónico	1,00
Nitrato de potasio	1,00
Cloruro férrico	0,05
pH final: 7.0 ± 0.2	

Fuente:(Atlas, 2004, p. 273)

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

2.3.1 Evaluación del crecimiento de los clones en medio PCA suplementados con petróleo, diésel y tensoactivos.

Para evaluar la tolerancia de los clones bacterianos seleccionados se procedió a repicar cada clon sobre las cajas Petri con medio PCA suplementado con cada una de las presiones

selectivas, los repiques se hicieron cada 48 horas de las bacterias que mostraron crecimiento, excepto para los tensoactivos cuyo crecimiento se reportó a las 72 horas

- Concentraciones de diésel fueron: 0,25 %, 0,5 %, 1%, 2% y 4% v/v.
- Concentraciones de petróleo fueron: 0,1 %, 0,25 %, 0,5 %, 1%, 2% y 4% v/v.
- Los tensoactivos utilizados fueron: amonio cuaternario y ácido sulfónico lineal en concentraciones de 500 y 1000 ppm, respectivamente.

2.3.2 Evaluación del crecimiento de los clones en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con diésel, petróleo, benceno, tolueno y fenol.

Para identificar clones bacterianos capaces de crecer en presencia de diésel, petróleo, benceno, tolueno y fenol se procedió a sembrar cada clon en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con cada una de las presiones seleccionadas (1 % v/v), las pruebas se realizaron por duplicado y se incubaron a 24 grados Celsius durante 48 hora, transcurrido este tiempo se reportó el crecimiento de cada clon de los cuales se realizaron dos repiques sucesivos con el mismo intervalo de tiempo (48 horas) y temperatura (24 °C) con el fin de demostrar que la bacteria está creciendo a expensas del contaminante usado como suplemento.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Muestras de suelo.

Con la finalidad de obtener una muestra representativa de la piscina de desechos de petróleo, se utilizó el método de muestreo sistemático por cuadrículas, para lo cual se procedió a dividir el suelo en 12 cuadrículas de aproximadamente siete por seis metros (Figura 1-3)

Debido a una notable heterogeneidad en el punto 8 (Tabla 1-2) se tomó otra muestra para ser analizada independientemente.

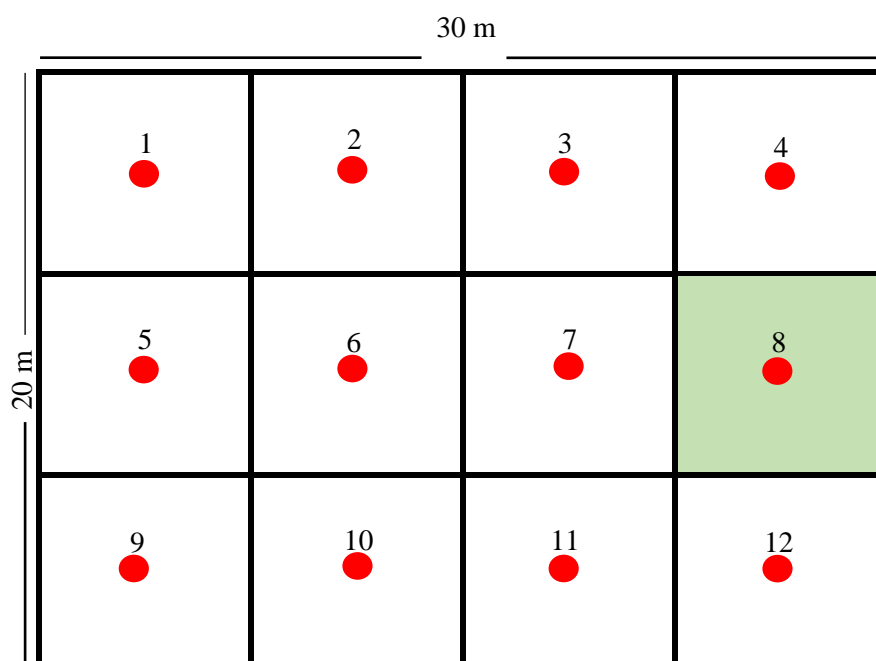


Figura 1-3: Mapa de los puntos de muestreo sobre la piscina de desechos de petróleo

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

3.1.1 Determinación de la temperatura in situ.

La temperatura de cada punto de muestreo se registró en grados Celsius (Tabla 1-3). Los valores que determinaron la temperatura de la muestra SC1 tuvieron diferencias en los puntos 5, 6 y 7 cuyas temperaturas fueron superiores al resto (28, 27 y 27°C respectivamente), estos valores son equivalentes a los de la muestra SC2 cuyas temperaturas en los mismos puntos también son altas (25, 24, 23 °C respectivamente).

En general, el promedio de temperaturas para SC1 fue 25 °C y para SC2: 23 °C, mientras que para las muestras SDC1 y SDC2 las temperaturas fueron 23 y 22 °C respectivamente, finalmente las temperaturas de las muestras SNC fueron similares (22 °C).

Demostrándose que la temperatura es mayor en las muestras recolectadas entre 0-30 centímetros de profundidad que aquellas más profundas (30-60 centímetros) excepto en las muestras SNC1 y SNC2 donde la temperatura es igual en ambos niveles.

Tabla 1-3: Determinación de la temperatura de cada muestra de suelo

MUESTRA	PUNTO	TEMPERATURA	\bar{x}
		°C	
SC1	1	24	25
	2	24	
	3	23	
	4	24	
	5	28	
	6	27	
	7	27	
	8	23	
	9	24	
	10	25	
	11	23	
	12	23	
SC2	1	23	23
	2	22	
	3	23	
	4	23	
	5	25	
	6	24	
	7	23	
	8	22	

	9	23	
	10	22	
	11	23	
	12	23	
SDC1	8	23	23
SDC2	8	22	22
SNC1	13	22	22
SNC2	13	22	22

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

La temperatura observada en los puntos 5, 6 y 7 son mayores, posiblemente a que en estos puntos la vegetación era escasa y por ende los rayos del sol llegaban directamente al suelo, mostrándose este lugar más seco que el resto.

3.2 Obtención de aislados bacterianos.

3.2.1 Recuento bacteriológico.

Los resultados para evaluar el crecimiento de las colonias de cada muestra de suelo sobre medio PCA (grupo1) y sobre éste suplementado con diésel (grupo 2), se expresan en unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de suelo, cabe indicar que las muestras SDC1 y SDC2 están incluidas en las muestras compuestas SC1 y SC2 respectivamente.

En la tabla 2-3 se muestran las UFC/g de suelo, observándose que el número de colonias determinadas en el suelo contaminado (SC), independientemente del criterio de selección (grupo 1 y 2), es mayor al número de colonias determinadas en el suelo no contaminado (SNC). Al adicionar diésel sobre el medio (grupo2) se obtuvieron más UFC de las muestras SC y SNC, que únicamente sobre el medio PCA (grupo 1). Con referencia a la profundidad a la que fueron tomadas las muestras, tanto para el grupo 1 y 2, de la muestra SC tomadas a una profundidad entre 0-30 cm poseen mayor número de UFC respecto a aquellas tomadas entre 30-60 cm, caso contrario para la muestra SNC.

Tabla 2-3: Conteo microbiano inicial a las 48 horas

MUESTRA	GRUPO 1		GRUPO 2	
	(UFC/g)			
SDC1	60.000	418.000	73.000	237.000
SDC2	776.000		401.000	
SC1	556.500	333.625	578.000	366.875
SC2	110.750		155.750	
SNC1	135.750	246.375	188.000	256.625
SNC2	357.000		325.250	

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

Estudios realizados por Oropeza (2010) y Pinos (2008), en suelos contaminados con hidrocarburos se muestran mayor número de UFC que de aquellos suelos menos contaminados o no contaminados, estos resultados coinciden con los reportados en este estudio puesto que de las muestras SC se obtuvieron más UFC que de las muestras SNC, así mismo, el crecimiento sobre diésel más medio aumento el número de UFC. Además ambas investigaciones reportan que el impacto de petróleo disminuye la diversidad microbológica del suelo; considerando esto, se puede suponer que también en el suelo contaminado de esta investigación, a pesar de haber mayor cantidad de UFC la diversidad puede ser menor.

3.2.2 Selección de aislados bacterianos.

A partir de los aislados bacterianos, se seleccionaron 30 clones del grupo 1 y 30 clones del grupo 2, de acuerdo a sus características morfológicas y tasa de crecimiento. Tomando en cuenta que el 100 % es el total de clones seleccionados, se evaluó el porcentaje de clones de cada muestra de suelo tanto del grupo 1 y 2 (Tabla 3-3)

Tabla 3-3: Bacterias seleccionadas de cada muestra de suelo.

MUESTRA	BACTERIAS ESTABILIZADAS			
	GRUPO 1	PORCENTAJE	GRUPO 2	PORCENTAJE
SC1	4	13,33%	2	6,67%
SC2	3	10,00%	2	6,67%
SDC1	3	10,00%	4	13,33%
SDC2	7	23,33%	16	53,33%
SNC1	6	20,00%	2	6,67%
SNC2	7	23,33%	4	13,33%
TOTAL	30	100,00%	30	100,00%

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

3.2.3 Estabilización y reislamiento de clones bacterianos.

El proceso de estabilización de los 60 clones seleccionados mostró que todos los clones se adaptaron al medio de cultivo. Sin embargo durante el proceso de reislamiento, tres de los clones seleccionados (dos del grupo 1 y uno del grupo 2) mostraron estar formados por al menos dos organismos diferentes; por lo que no fueron considerados para las siguientes evaluaciones (Tabla 4-3).

Tabla 4-3: Bacterias estabilizadas de cada muestra de suelo.

MUESTRA	GRUPO 1			GRUPO 2		
	Aislados	Estabilizados	Reislados	Aislados	Estabilizados	Reislados
SC1	4	4	4	2	2	2
SC2	3	3	3	2	2	2
SDC1	3	3	3	4	4	4
SDC2	7	7	7	16	16	15
SNC1	6	6	6	2	2	2
SNC2	7	7	5	4	4	4
TOTAL	30	30	28	30	30	29

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

3.3 Caracterización bacteriana.

En la figura 2-3 se observa la apariencia macroscópica de los 57 clones del grupo 1 y 2 utilizados para las pruebas posteriores. El crecimiento de los clones del grupo 2 (obtenidos a partir del medio PCA suplementado con diésel) en general es mayor al de los clones del grupo 1 (obtenidos a partir de medio PCA) bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo de incubación, así mismo se puede observar que los clones del grupo 2 presentan mayor variabilidad de coloración (morado, amarillo, crema, azul, anaranjado, blanco).

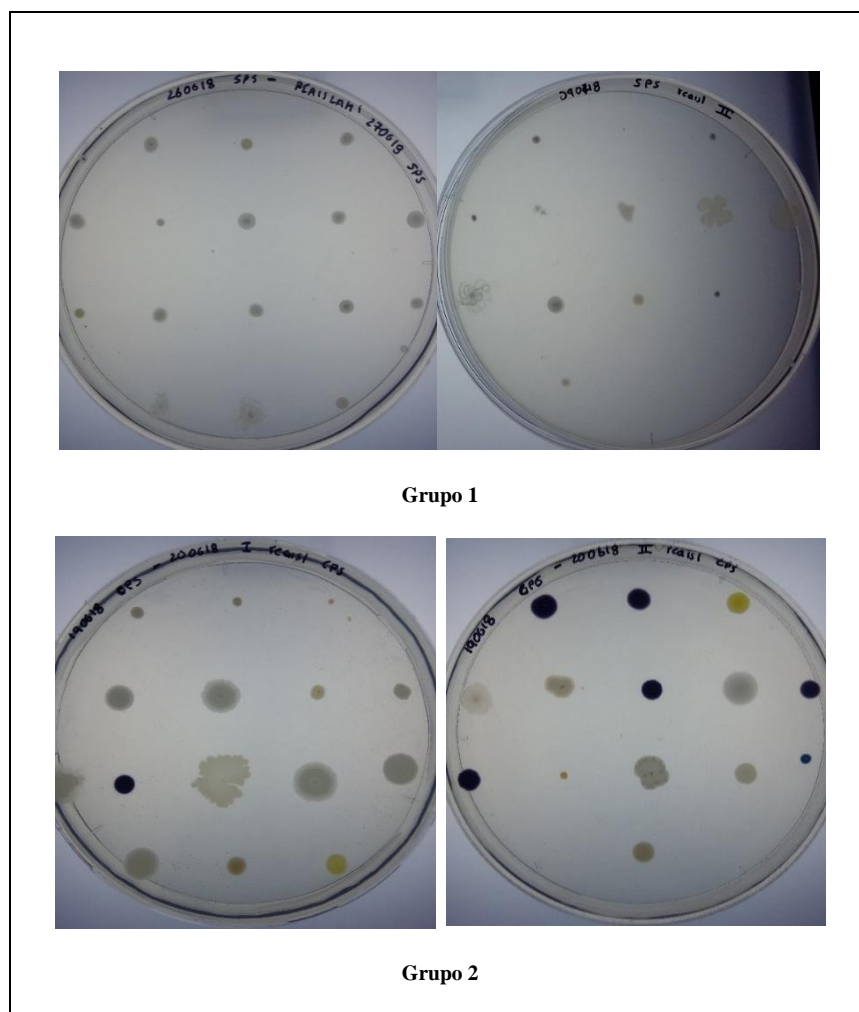


Figura 2-3: Clones seleccionados de las muestras de suelo

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

3.3.1 Características microscópicas.

A los 57 aislados bacterianos seleccionados, se los clasificó en 2 grupos: de acuerdo a su micro morfología (cocos o bacilos) y mediante tinción Gram de acuerdo a sus características tintoriales (positivos o negativos), lo cual permitió además analizar su pureza.

De los 57 clones seleccionados todos presentaron forma de bacilos, en cuanto a la tinción de Gram; nueve clones provenientes del suelo contaminado fueron negativos y el resto positivos (31), mientras que del suelo no contaminado un clon fue negativo y los 16 restantes fueron positivos (Tabla 5-3)

Tabla 5-3: Características microscópicas de los aislados bacterianos

GRUPO	MUESTRA	CLON	MICROMORFOLOGÍA	
			FORMA	GRAM
1	SC1	1	Bacilos	+
		2	Bacilos	+
		3	Bacilos	+
		4	Bacilos	+
2		5	Bacilos	+
		6	Bacilos	-
1	SC2	7	Bacilos	+
		8	Bacilos	+
		9	Bacilos	+
2		10	Bacilos	+
		11	Bacilos	+
1	SDC1	12	Bacilos	+
		13	Bacilos	+
		14	Bacilos	-
2		15	Bacilos	+
		16	Bacilos	+
		17	Bacilos	+
		18	Bacilos	-
1		SDC2	19	Bacilos
	20		Bacilos	-
	21		Bacilos	-
	22		Bacilos	+
	23		Bacilos	-
	24		Bacilos	+
	25		Bacilos	-

2		26	Bacilos	+
		27	Bacilos	+
		28	Bacilos	+
		29	Bacilos	+
		30	Bacilos	+
		31	Bacilos	+
		32	Bacilos	+
		33	Bacilos	+
		34	Bacilos	-
		35	Bacilos	+
		36	Bacilos	+
		37	Bacilos	+
		38	Bacilos	+
		39	Bacilos	+
		40	Bacilos	-
1	SNC1	41	Bacilos	+
		42	Bacilos	+
43		Bacilos	+	
44		Bacilos	+	
45		Bacilos	+	
46		Bacilos	-	
2		47	Bacilos	+
48		Bacilos	+	
1	SNC2	49	Bacilos	+
		50	Bacilos	+
51		Bacilos	+	
52		Bacilos	+	
53		Bacilos	+	
2		54	Bacilos	+
55		Bacilos	+	
56		Bacilos	+	
57	Bacilos	+		

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

Tabla: 6-3: Diferencia entre las características de la tinción de Gram de los clones aislados del suelo contaminado y no contaminado.

MUESTRA	BACILOS (+)	PORCENTAJE	BACILOS (-)	PORCENTAJE
SC1	5	83%	1	17%
SC2	5	100%	0	0%
SDC1	5	71%	2	29%
SDC2	16	73%	6	27%
SNC1	7	88%	1	13%
SNC2	9	100%	0	0%

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

Los resultados obtenidos muestran que en el suelo evaluado existe ausencia de cocos y en el caso de los bacilos predominan los bacilos Gram positivos, sin embargo; los resultados obtenidos en el suelo contaminado muestran un mayor porcentaje de bacilos Gram negativos (9 %) en comparación con el suelo no intervenido (6%) (Tabla 6-3), este resultado coincide con lo reportado por Venosa (1999) quien indica que para el caso de los hidrocarburos, las bacterias Gram negativas parecen encontrarse más adaptadas a esas fuentes de carbono (Venosa et al., 1999; citados en (Nisperuza, et al., 2010, p. 51).

Sin embargo Oropeza (2010) en su estudio titulado “diversidad microbiológica de bacterias y hongos en suelos impactados con petróleo provenientes de Yaracal, estado falcón, Venezuela” mostró en sus resultados que la mayor parte de la comunidad bacteriana estudiada es del tipo Bacilos Gram positivos (60% para las muestras impactadas; 84,62% para las muestras control)(Oropeza, 2010, p. 59), estos resultados son similares a los obtenidos en este estudio (91 % para las muestras de suelo contaminado; 94% para las muestras de suelo sin contaminación aparente).

3.3.2 Evaluación del crecimiento de los clones en medio PCA suplementado con diésel.

Los resultados para evaluar la tolerancia de los 57 clones seleccionados en diésel sobre medio PCA se detallan en la tabla 7-3, donde se muestra que 52 clones fueron capaces de crecer en presencia de diésel a una concentración de 4 % v/v, excepto los clones 23, 25, 28 y 39 provenientes del suelo contaminado que crecieron solo hasta concentraciones de 1 %, 1 %, 0,5 % y 0,25 % v/v, respectivamente, y el clon número 53 aislado del suelo no contaminado con crecimiento hasta 1 % v/v.

Tabla 7-3: Evaluación del crecimiento de los clones bacterianos en medio PCA suplementado con concentraciones crecientes de diésel (0,25-0,5-1-2-4 % v/v)

GRUPO	MUESTRA	CLON	INTENSIDAD DE CRECIMIENTO				
			0,25	0,5	1	2	4
1	SC1	1	3	5	4	3	4
		2	3	3	*	3	4
3		3	3	3	3	3	
4		4	3	3	2	3	
2		5	4	4	4	4	4
		6	2	3	1	3	2
1	SC2	7	3	4	*	4	3
		8	2	3	*	3	4
9		4	3	3	2	3	
2		10	1	1	1	1	1
		11	3	3	2	2	2
1	SDC1	12	5	4	4	3	3
		13	1	1	1	1	2
14		5	5	5	5	5	
2		15	2	2	1	3	2
		16	5	5	5	5	5
		17	3	4	4	3	3
	18	4	4	4	4	4	
1	SDC2	19	5	4	4	4	4
		20	3	3	3	3	3
		21	3	3	3	3	2
		22	3	2	3	3	2
		23	2	3	2	0	0
		24	2	3	1	2	2
25		2	2	2	0	0	
2		26	*	*	2	1	2
		27	3	3	4	2	2
		28	2	2	0	0	0
		29	3	3	3	3	3
	30	3	2	2	3	2	
	31	4	3	4	4	4	

		32	4	3	3	3	3
		33	3	2	5	3	3
		34	3	3	1	3	3
		35	3	4	3	3	3
		36	3	3	2	3	3
		37	3	2	3	3	3
		38	5	3	2	2	2
		39	1	0	0	0	0
		40	3	3	4	3	3
1	SNC1	41	4	4	3	3	3
		42	4	4	4	4	4
		43	5	5	5	2	2
		44	5	5	5	5	5
		45	3	3	2	3	3
		46	5	5	5	*	4
2	SNC1	47	4	4	4	4	4
		48	2	2	1	2	3
1	SNC2	49	3	3	4	3	3
		50	5	4	3	4	4
		51	5	5	3	4	4
		52	5	5	5	2	5
		53	2	2	2	0	0
2	SNC2	54	4	4	4	4	4
		55	2	2	2	2	2
		56	5	3	2	3	3
		57	*	4	4	4	4

Las pruebas se realizaron cada 48 horas. 0,1: < 0,1 cm. 1: 0,1cm. 2: 0,2 cm. 3: 0,3cm. 4: 0,5 cm. 5: \geq 1 cm. *: no determinado.

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

De cada muestra de suelo, se obtuvieron clones tolerantes a diésel a la concentración máxima (4 % v/v) con un crecimiento igual o superior a tres; de la muestra SC1 los clones 1, 2, 3, 4 y 5 (Grafico 1-3A), de SC2 los clones 7, 8 y 9 (Grafico 1-3B), de SDC1 los clones 12, 14, 16 y 18 (Grafico 2-3A), de SDC2 los clones 19, 20, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 40 (Grafico 2-3ByC), de SNC1 los clones 41, 42, 44, 45, 46, 47 y 48 (Grafico 3-3A) y de SNC2 los clones 49, 50, 51, 52, 54, 56 y 57 (Grafico 3-3B).

Los cuatro clones con mayor relevancia por presentar mayor crecimiento y mantenerse igual al aumentar la concentración de diésel, están distribuidos de la siguiente manera: de la muestra SDC1 los clones 14, 16 (Grafico 2-3B, 2-3C), de SNC1 el clon 44 (Grafico 3-3A) y de SNC2 el clon 52 (Grafico 3-3B). Cabe señalar que en su mayoría estos clones provienen de las muestras tomadas entre 0-30 cm de profundidad.

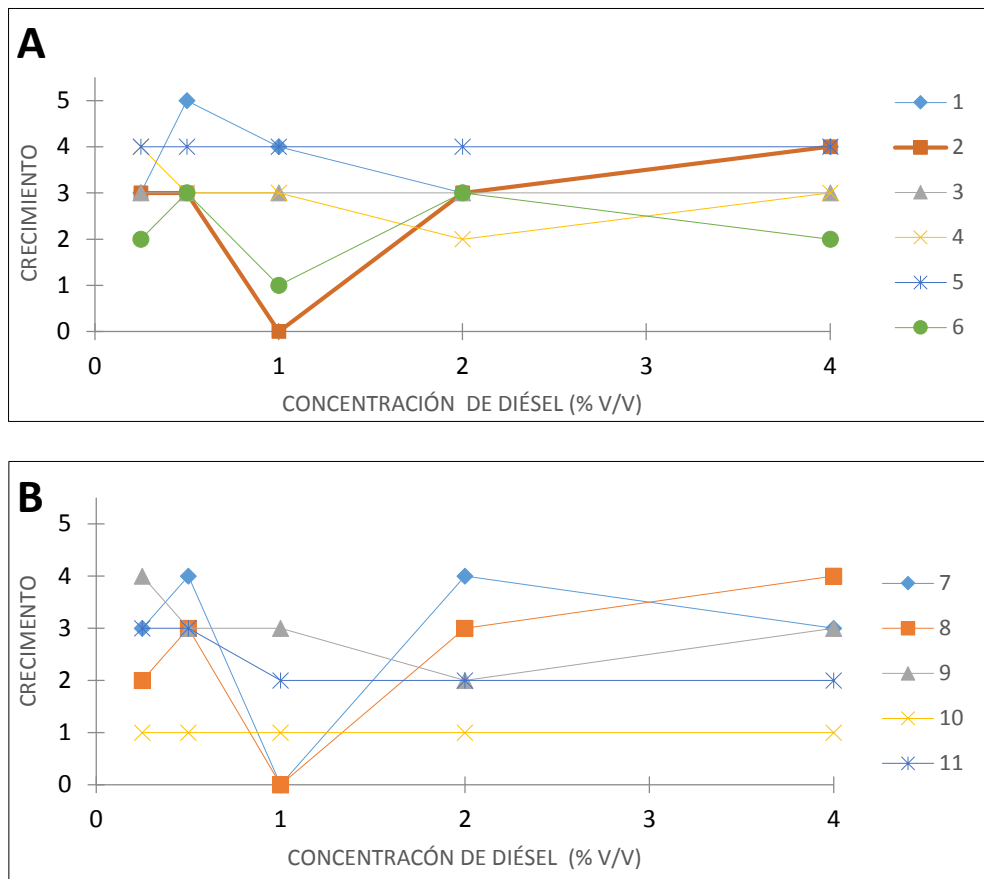


Gráfico 1-3: Intensidad de crecimiento de los clones seleccionados en medio PCA suplementado con concentraciones crecientes de diésel (0,25-0,5-1-2-4 % v/v). A: Clones provenientes del suelo contaminado entre 0-30 cm de profundidad (SC1), B: Clones provenientes del suelo contaminado entre 30-60 cm de profundidad (SC2)

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

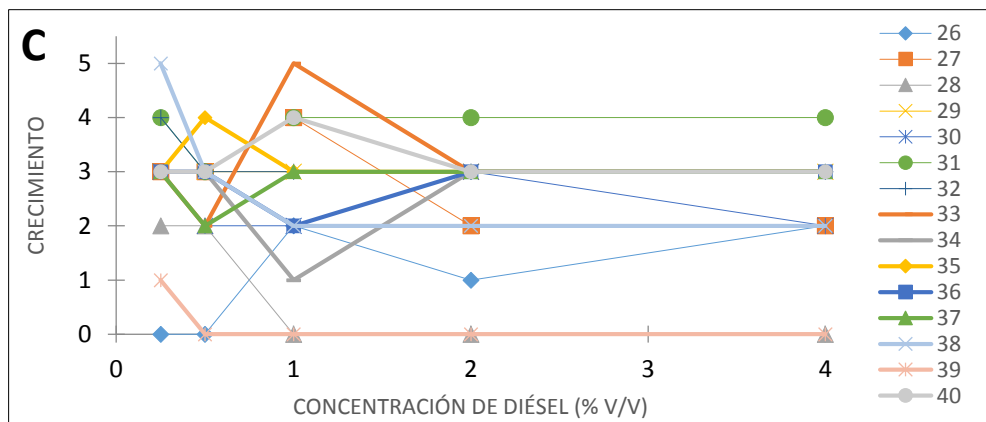
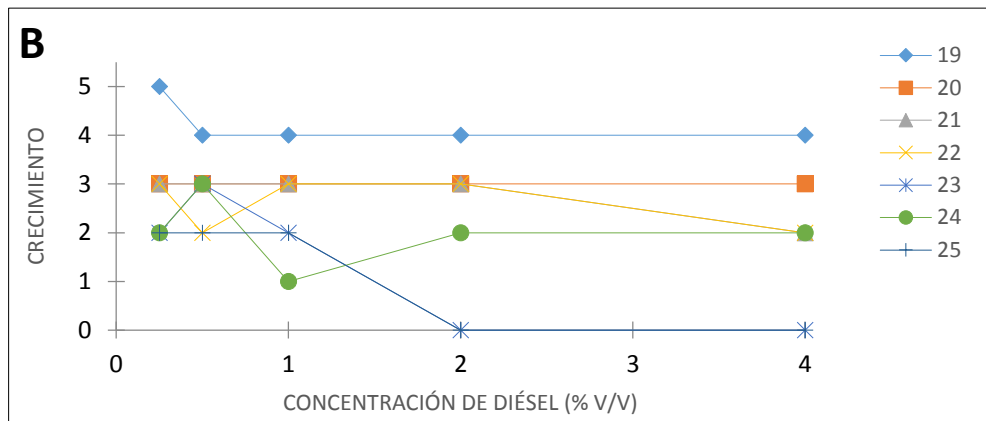
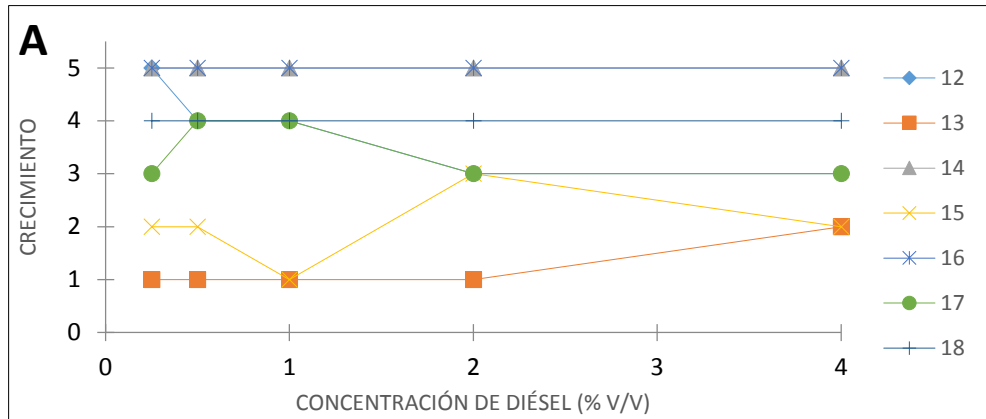


Gráfico 2-3: Intensidad de crecimiento de los clones seleccionados en medio PCA suplementado con concentraciones crecientes de diésel (0,25-0,5-1-2-4 % v/v).A: Clones provenientes del suelo diferente contaminado entre 0-30 cm de profundidad (SDC1), B y C: Clones provenientes del suelo diferente contaminado entre 30-60 cm de profundidad (SDC2).

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

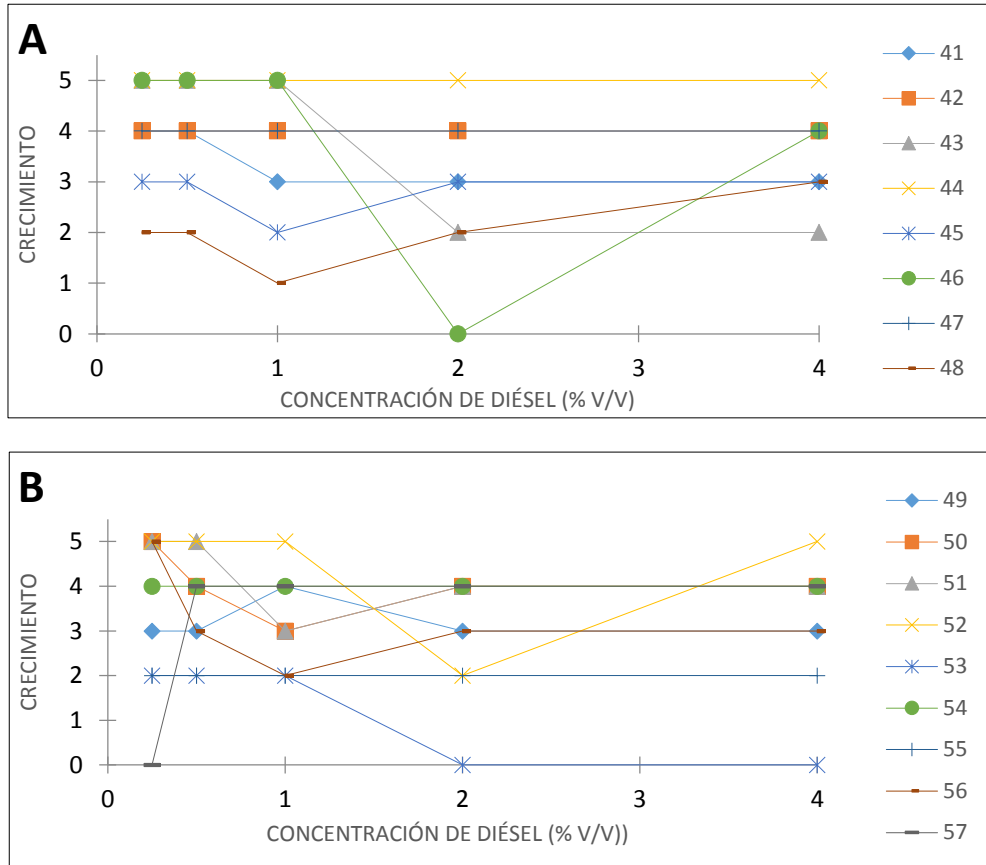


Gráfico 3-3: Intensidad de crecimiento de los clones seleccionados en medio PCA suplementado con concentraciones crecientes de diésel (0,25-0,5-1-2-4 % v/v). A: Clones provenientes del suelo no contaminado entre 0-30 cm de profundidad (SNC1), B: Clones provenientes del suelo no contaminado entre 30-60 cm de profundidad (SNC2)

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

3.3.3 Evaluación del crecimiento de los clones en medio PCA suplementado con petróleo.

Los resultados para evaluar la tolerancia de los 57 clones seleccionados en petróleo sobre medio PCA se detallan en la tabla 8-3, donde se muestra que 52 clones fueron capaces de crecer en presencia de petróleo a una concentración de 4 % v/v. Los clones 2, 11, 23, 25 y 39 provenientes del suelo contaminado solo toleraron concentraciones de 0,5 %, 1 %, 2 %, 2 % y 0,1 % v/v respectivamente.

Tabla 8-3: Evaluación del crecimiento de los clones bacterianos en medio PCA suplementado con concentraciones crecientes de petróleo (0,1-0,25-0,5-1-2-4 %v/v)

GRUPO	MUESTRA	CLON	INTENSIDAD DE CRECIMIENTO					
			0,1	0,25	0,5	1	2	4
1	SC1	1	2	1	3	3	2	1
		2	3	2	2	0	0	0
3		3	3	2	2	2	3	
4		1	1	1	1	0,1	1	
2		5	3	2	1	2	3	2
		6	1	1	2	1	1	2
1	SC2	7	4	4	2	*	3	4
		8	3	4	2	4	5	5
9		2	1	1	1	1	1	
2		10	1	0,1	0,1	1	0,1	0,1
		11	1	1	1	2	0	0
1		SDC1	12	3	1	1	1	1
	13		1	2	1	1	0,1	1
14	3		5	4	5	1	4	
2	15		2	1	0,1	2	1	1
	16		5	5	5	5	5	5
1	SDC2		17	3	1	3	4	1
		18	2	1	1	3	1	2
19		3	1	1	1	1	2	
2		20	2	0,1	1	*	0,1	2
		21	1	1	2	1	1	1
		22	1	1	1	1	1	1
		23	1	1	1	2	1	0
		24	2	0,1	0,1	1	1	1
		25	2	1	1	1	1	0
1		26	0,1	0,1	*	0,1	*	1
		27	2	1	1	3	2	2
		28	3	2	2	3	2	2
	29	2	1	2	3	2	2	
	30	2	1	1	2	2	1	
	31	5	2	1	2	2	2	
	32	3	1	1	1	1	1	
	33	2	1	0,1	2	2	1	
	34	0,1	1	1	1	1	1	

		35	1	1	1	3	1	2		
		36	2	1	1	1	1	1		
		37	1	1	1	1	1	1		
		38	3	2	2	3	1	1		
		39	1	0	0	0	0	0		
		40	3	2	1	2	1	1		
1	SNC1	41	4	3	2	2	3	2		
		42	3	2	3	3	3	2		
		43	2	1	2	1	1	1		
		44	5	3	5	5	5	5		
		45	4	3	3	3	2	3		
		46	2	2	2	1	2	3		
2		47	3	2	1	2	2	3		
		48	1	1	1	0,1	1	1		
1	SNC2	49	2	1	1	1	1	1		
		50	1	1	3	1	1	1		
		51	5	*	3	5	5	5		
		52	5	5	5	5	5	5		
		53	2	1	1	1	2	2		
		2		54	3	3	1	3	2	3
				55	3	3	3	3	3	4
				56	2	1	1	1	0,1	1
57	3			3	3	3	3	4		

Las pruebas se realizaron cada 48 horas. 0,1: < 0,1 cm. 1: 0,1cm. 2: 0,2 cm. 3: 0,3cm. 4: 0,5 cm. 5: \geq 1 cm.*: no determinado.

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

Los clones que sobrevivieron a la mayor concentración de petróleo (4 % v/v) con crecimiento igual o superior a 3 fueron los siguientes: de la muestra SC1 el clon3 (Grafico 4-3A), de SC2 los clones 7 y 8 (Grafico 4-3B), de SDC1 los clones 14 y 16 (Grafico 5-3A), de SNC1 los clones 44, 45, 46 y 47 (Grafico 6-3A) y de SNC2 los clones 51, 52, 54, 55 y 57 (Grafico 6-3B)

Con el incremento de la concentración de petróleo, los clones que se vieron poco afectados y mostraron mayor crecimiento hasta la mayor concentración fueron: de la muestra SC2 el 8 (Grafico 4-3B), de SDC1 el clon16 (Grafico 5-3A), de SNC1 el 44 (Grafico 6-3A) y de SNC2 los clones 51 y 52 (Grafico 6-3B).

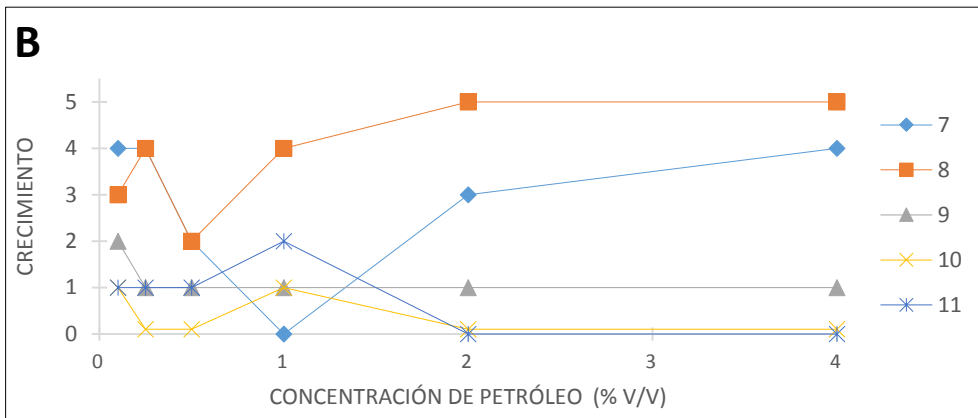
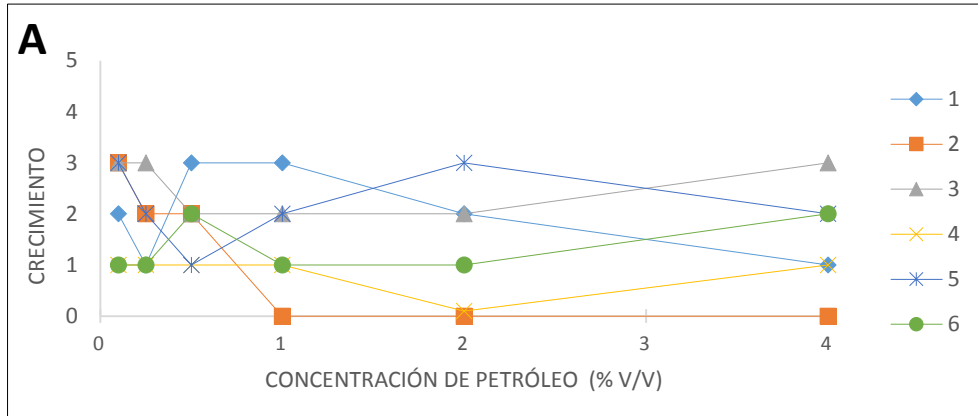


Gráfico 4-3: Intensidad de crecimiento de los clones seleccionados en medio PCA suplementado con concentraciones crecientes de petróleo (0,1-0,25-0,5-1-2-4 % v/v). A: Clones provenientes del suelo contaminado entre 0-30 cm de profundidad (SC1), B: Clones provenientes del suelo contaminado entre 30-60 cm de profundidad (SC2)

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

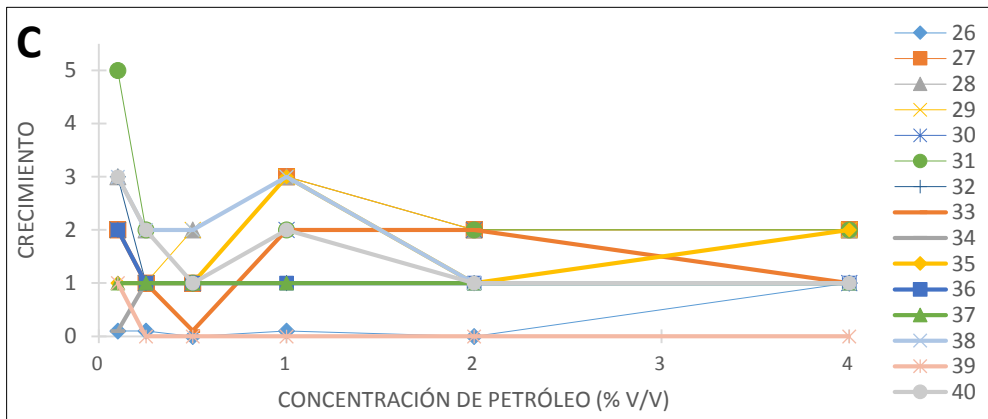
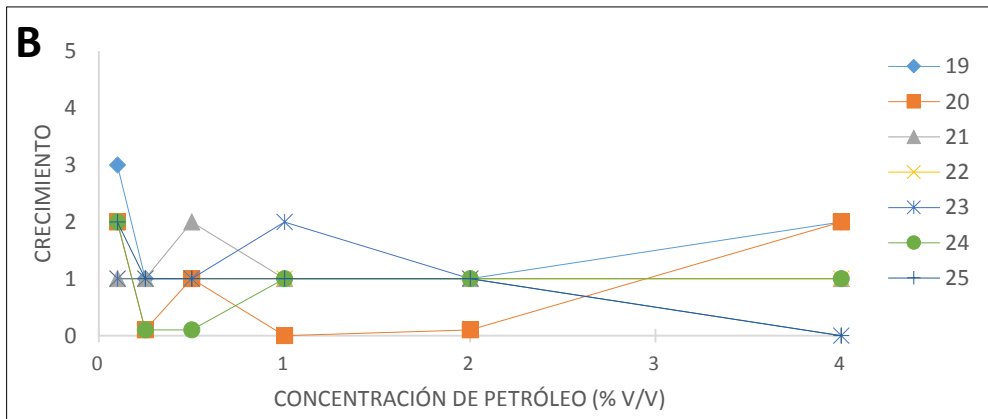
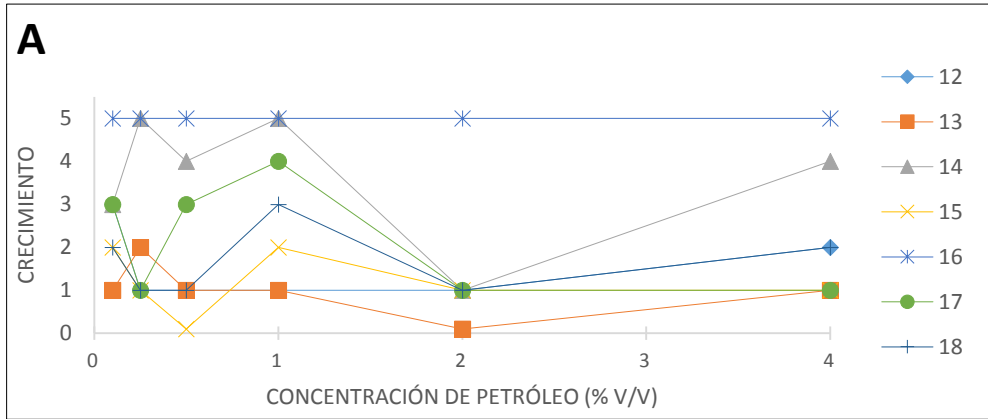


Gráfico 5-3: Intensidad de crecimiento de los clones seleccionados en medio PCA suplementado con concentraciones crecientes de petróleo (0,1-0,25-0,5-1-2-4 % v/v). A: Clones provenientes del suelo diferente contaminado entre 0-30 cm de profundidad (SDC1). B y C: Clones provenientes del suelo diferente contaminado entre 30-60 cm de profundidad (SDC2).

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

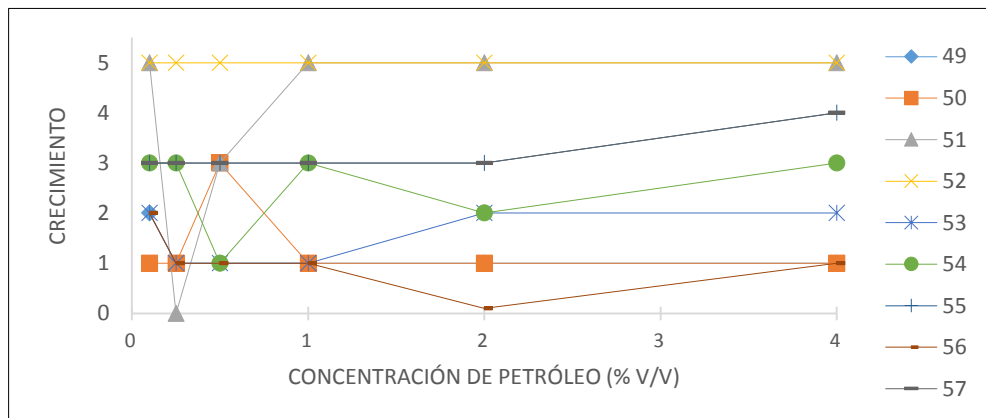
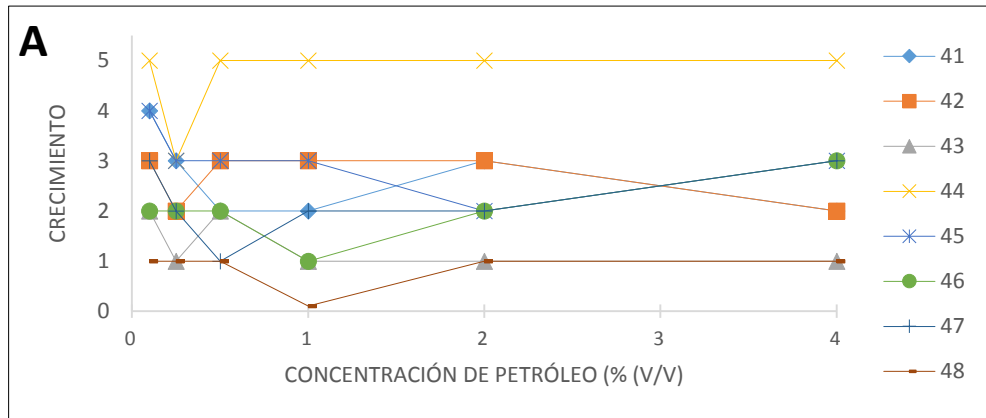


Gráfico 6-3: Intensidad de crecimiento de los clones seleccionados en medio PCA suplementado con concentraciones crecientes de petróleo (0,1-0,25-0,5-1-2-4 % v/v). A: Clones provenientes del suelo no contaminado entre 0-30 cm de profundidad (SNC1), B: Clones provenientes del suelo no contaminado entre 30-60 cm de profundidad (SNC2),

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

3.3.4 Comparación de clones del suelo contaminado y del suelo no intervenido tolerantes a diésel y petróleo con crecimiento significativo.

Considerando el 100 % a los clones seleccionados de cada muestra de suelo se determinó el porcentaje de las UFC de cada muestra a una concentración de 4 % v/v de diésel y petróleo. Cabe recalcar que las muestras SDC1 y SDC2 también pertenecen a la piscina de desechos de petróleo (SC1 y SC2), por ende las comparaciones se registrarán solo a SC y SNC.

Las pruebas en el laboratorio respaldan la selección de las cepas más tolerantes y adaptadas, por lo tanto a mayor crecimiento se asume una mayor tolerancia, por esta razón en los gráficos 7-3 únicamente se muestra el porcentaje de clones con un crecimiento superior a 2 sobre una concentración del 4 % v/v tanto de diésel como de petróleo.

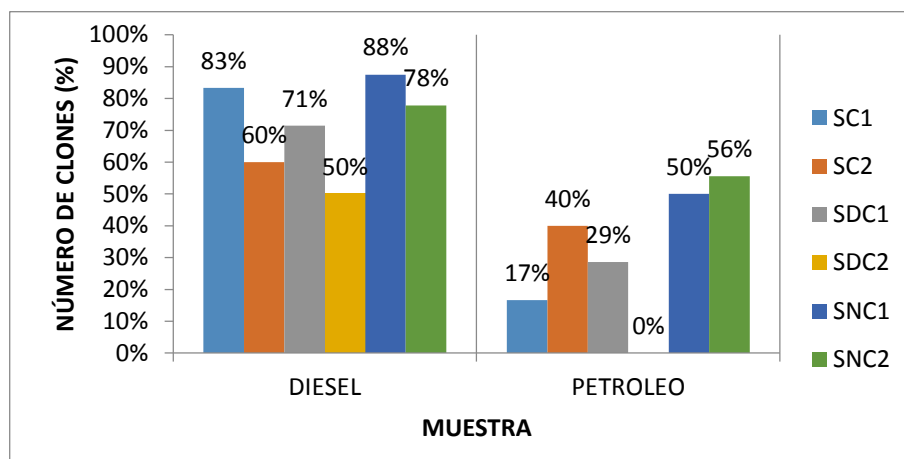


Gráfico 7-3: Crecimiento de los clones superior o igual a tres en medio PCA suplementado con diésel y petróleo (4 % v/v)

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

Los resultados de tolerancia ante petróleo y diésel mostrados por la población de clones evaluados (Gráfico 7-3) indican que existe una mayor tolerancia al diésel que al petróleo. Sin embargo, al comparar el crecimiento entre los clones aislados del suelo contaminado y del no contaminado, para el caso del diésel, muestran valores similares de tolerancia, siendo importante hacer notar que en el caso de petróleo el nivel de tolerancia es mayor en los clones provenientes del suelo no contaminado.

3.3.5 Evaluación del crecimiento de los clones en medio PCA suplementado con tensoactivos: Amonio Cuaternario (AC) y Acido Sulfónico lineal (ASL).

Las pruebas para determinar el crecimiento de los clones en medio PCA suplementado con tensoactivos, se realizó sobre los 57 clones seleccionados, sin embargo en la tabla 9-3 se indican únicamente los clones que mostraron crecimiento al menos en el primer repique. Los resultados indican que nueve fueron los clones capaces de crecer en presencia de ASL, distribuidos de la siguiente manera: dos clones provenientes de la muestra SDC1, cinco de SDC2 y dos de SNC1, de los cuales cinco también crecieron en presencia de AC: un clon proveniente de la muestra SDC1, dos de SDC2 y dos de SNC1.

Tabla 9-3: Evaluación del crecimiento de los clones bacterianos en medio PCA suplementado con tensoactivos: Amonio cuaternario (500 ppm) y ácido sulfónico lineal (1000 ppm)

GRUPO	MUESTRA	CLON	AC 500 ppm	ASL 1000 ppm
1	SDC1	14	3	3
2		17	0	3
1	SDC2	20	0	3
		21	0	2
		23	0	3
32		2	2	
2		40	2	2
1	SNC1	46	2	2
2		48	2	2

Crecimiento reportado a las 72 horas. 0: sin crecimiento. 2: 0,2 cm. 3: 0,3cm.

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

Los resultados de crecimiento de los clones (Tabla 9-3) demuestran que el AC (500 ppm) posee una mayor toxicidad en comparación con el ASL (1000ppm), inhibiendo totalmente el crecimiento de cuatro de los nueve clones evaluados. Es importante hacer notar que los clones 14, 32, 40, 46 y 48 son tolerantes a los dos tensoactivos pudiendo ser importantes en procesos de biorremediación de ambientes con presencia de tensoactivos.

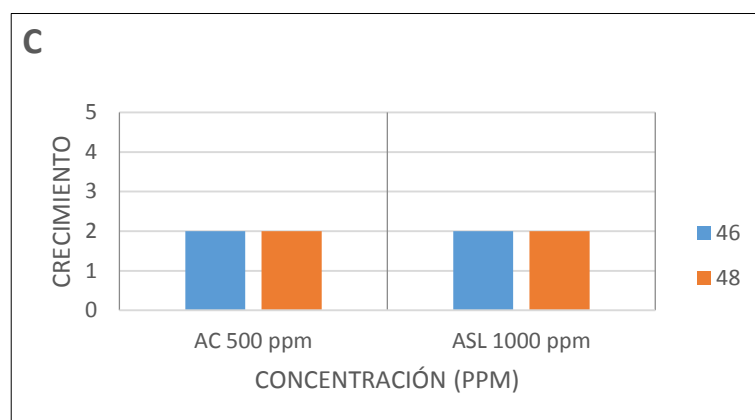
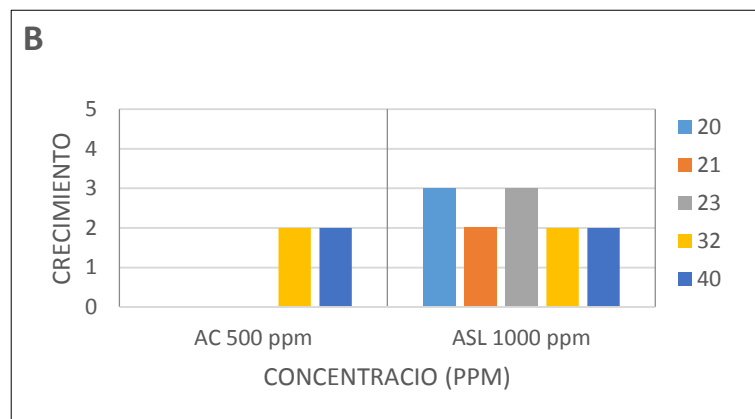
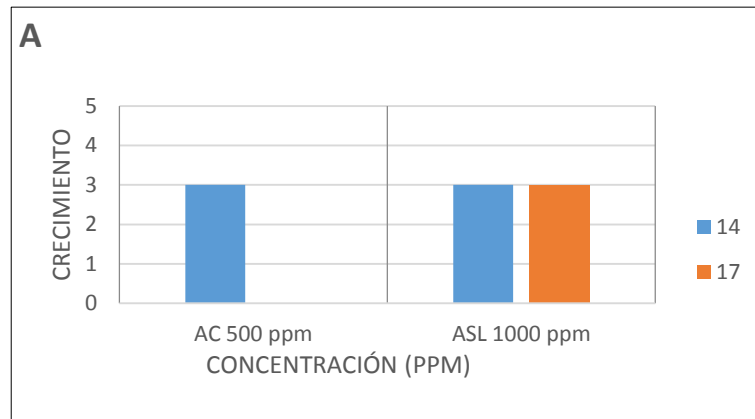


Gráfico 8-3: Crecimiento de los clones en medio PCA suplementado con tensoactivos: Amonio cuaternario (500 ppm) y ácido sulfónico lineal (1000 ppm). A: clones provenientes de la nuestra SDC1, B: clones provenientes de la nuestra SDC2, C: clones provenientes de la nuestra SNC1

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

Considerando el 100 % a los clones seleccionados de cada muestra de suelo se determinó el porcentaje de los clones de cada muestra tolerantes a ASL (1000 ppm) y AC (500 ppm) (Gráfico 9-3). Cabe recalcar que las muestras SDC1 y SDC2 también pertenecen a la piscina de desechos de petróleo (SC1 y SC2), por ende las comparaciones se registrarán solo a SC y SNC.

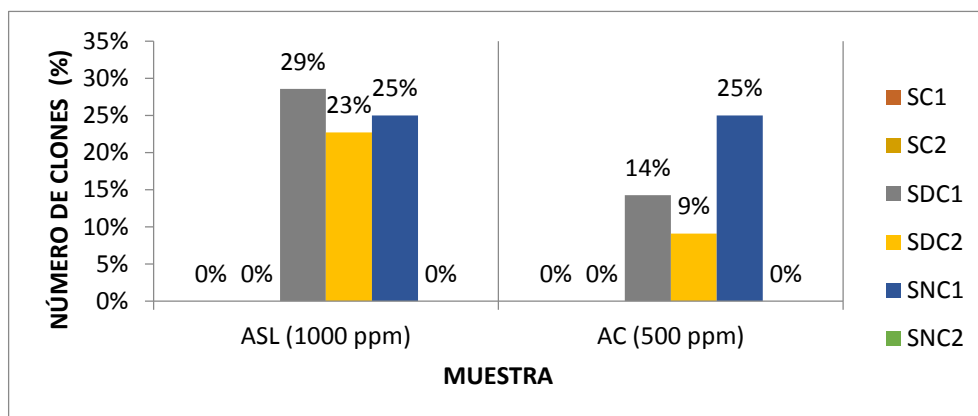


Gráfico 9-3: Clones con crecimiento 2 y 3 tolerantes a ASL y AC de cada muestra de suelo

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

3.3.6 Evaluación del crecimiento de los clones en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con diésel.

Con el fin de evaluar la capacidad de utilizar el diésel como fuente de carbono y energía, se procedió a sembrar los 57 clones seleccionados en medio Mínimo Bushnell-Haas suplementado con diésel, obteniéndose como resultado (Tabla 10-3) que los clones 2, 12, 15, 17, 19, 20, 27, 31, 44, 47 y 52 fueron capaces de crecer hasta el tercer repique.

Tabla 10-3: Evaluación del crecimiento de los clones en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con diésel como única fuente de carbono

GRUPO	MUESTRA	CLON	DIÉSEL (1 % v/v)		
			Repique 1	Repique 2	Repique 3
1	SC1	2	1	1	1
		3	1	0	0
		4	1	0	0
	SC2	7	1	0	0

		8	1	0	0
		9	1	0	0
	SDC1	12	3	1	1
		13	1	0	0
		14	1	0	0
	SDC2	19	2	1	1
		20	1	1	1
		21	1	0	0
		23	1	0	0
		24	1	0	0
	SNC1	43	1	0	0
		44	5	1	1
		45	1	0	0
		46	1	0	0
	SNC2	50	2	0	0
		51	1	0	0
52		5	1	1	
2	SC1	5	2	1	0
	SC2	10	1	0	0
		11	1	0	0
	SDC1	15	1	1	1
		17	4	4	3
	SDC2	27	1	1	1
		28	1	1	0
		31	2	1	1
		33	1	0	0
		35	1	0	0
		38	1	0	0
	SNC1	47	2	1	1
48		1	0	0	
SNC2	54	2	1	0	

Los repiques se realizaron cada 48 horas. 0: sin crecimiento. 1: 0,1cm. 2: 0,2 cm. 3: 0,3 cm, 5: ≥ 1 cm

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

El clon 17 mostró crecimiento superior al resto y casi similar en los tres repiques (realizados cada 48 horas), observándose en los primeros repiques de un color translucido que en el tercer

repique se torna blanquecino (Figura 3-3), cabe recalcar que inicialmente este fue aislado usando como presión selectiva el diésel (grupo 2)

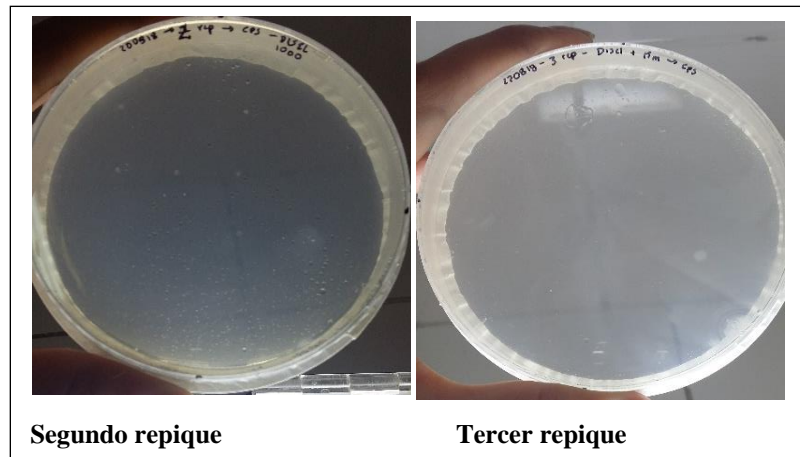


Figura 3-3: Aspecto del crecimiento de los clones (grupo 2) en medio Bushnell-Haas suplementado con diésel

Realizado por: Moreno, Doris; 2019.

Los resultados obtenidos sobre el metabolismo de diésel específicamente del clon 17, tienen relación con lo expuesto por Hernández (2018) quien aisló una cepa bacteriana de suelo contaminado con diésel, la misma que se cultivó en placa con medio mínimo y diésel (1 % v/v) como única fuente de carbono, mostrando colonias de mayor tamaño a las 48 horas a 30 °C, a concentraciones mayores de diésel (3 y 5% v/v) esta.

3.3.7 Evaluación del crecimiento de los clones en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con petróleo.

Para evaluar la capacidad que tienen los clones de utilizar petróleo como única fuente de carbono y/o energía, se realizaron tres repiques sucesivos cada 48 horas de los 57 clones sobre medio mínimo Bushnell-Haas suplementado con petróleo. Los resultados (Tabla 11-3) indican que los clones 13, 17, 22, 23 y 56 crecieron hasta el tercer repique.

Tabla11-3: Evaluación del crecimiento de los clones en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con petróleo como única fuente de carbono

GRUPO	MUESTRA	CLON	PETRÓLEO (1 % v/v)		
			Repique 1	Repique 2	Repique 3
1	SC1	1	1	0	0
		2	1	0	0
		3	1	1	0
	SC2	8	1	0	0
		9	1	0	0
	SDC1	12	1	1	0
		13	1	1	1
	SDC2	22	1	1	1
		23	3	1	1
	SNC1	44	2	2	0
		46	1	2	0
	SNC2	49	1	1	0
50		1	0	0	
52		2	2	0	
2	SC1	5	1	0	0
	SDC1	16	2	1	0
		17	2	3	4
		18	1	2	0
	SDC2	27	2	0	0
		28	2	1	0
		29	1	1	0
		31	1	0	0
		32	1	0	0
	SNC2	54	2	1	0
		55	2	1	0
56		1	1	1	

Los repiques se realizaron cada 48 horas. 0: sin crecimiento. 1: 0,1cm. 2: 0,2 cm. 3: 0,3cm. 4: 0,5 cm.

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

Entre los clones evaluados destaca el clon 17 aislado de la muestra SDC1 (grupo2), el cual presento mayor crecimiento y que en cada repique aumento su tamaño.

3.3.8 Evaluación del crecimiento de los clones en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con benceno.

Mediante tres repiques sucesivos cada 48 horas se evaluó el crecimiento de los clones capaces de desarrollarse en medio Bushnell-Haas suplementado con benceno (1 % v/v) como única fuente de carbono, los resultados se detallan en la Tabla 12-3 donde se puede evidenciar que los clones capaces de crecer hasta el tercer repique fueron el 17, 28, 31, 47 y 54

Tabla 12-3: Evaluación del crecimiento de los clones en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con benceno como única fuente de carbono

GRUPO	MUESTRA	CLON	BENCENO (1 % v/v)		
			Repique 1	Repique 2	Repique 3
1	SC1	2	1	0	0
		3	1	0	0
		4	1	0	0
	SC2	7	1	0	0
		8	1	0	0
		9	1	0	0
	SDC1	12	1	0	0
		13	1	0	0
		14	1	1	0
	SDC2	19	1	0	0
		20	1	0	0
		21	1	0	0
		24	1	0	0
	SNC1	41	1	0	0
		43	1	0	0
		44	5	1	0
		45	1	0	0
	SNC2	49	1	0	0
		50	2	1	0
		51	2	0	0
52		5	1	0	
2	SC1	5	2	0	0
		6	1	0	0
	SC2	10	1	0	0

		11	1	0	0
SDC1		15	2	0	0
		16	1	0	0
		17	5	5	5
		18	1	0	0
SDC2		27	2	0	0
		28	1	1	3
		31	1	1	3
		32	1	0	0
		33	1	0	0
		35	1	0	0
		37	1	0	0
		38	1	0	0
SNC1		47	1	1	3
		48	1	0	0
SNC2		54	2	1	1
		55	1	0	0
		56	1	0	0
		57	1	0	0

Los repiques se realizaron cada 48 horas. 0: sin crecimiento. 1: 0,1cm. 2: 0,2 cm. 3: 0,3cm.5: ≥ 1 cm

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

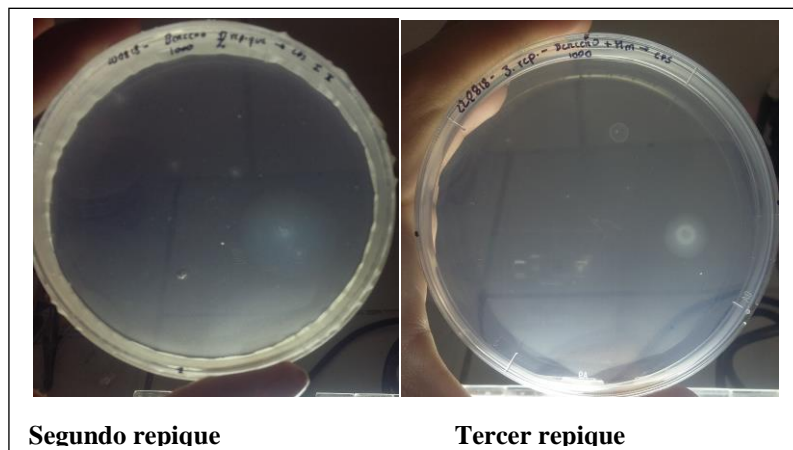


Figura 4-3: Aspecto del crecimiento de los clones (grupo 2) en medio Bushnell-Haas suplementado con benceno

Realizado por: Moreno, Doris; 2019.

3.3.9 Evaluación del crecimiento de los clones en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con tolueno.

La evaluación del crecimiento de los clones en medio Bushnell-Haas suplementado con Tolueno (1 % v/v) como única fuente de carbono se detallan en la tabla 13-3, observándose que los clones 1, 2, 3, 5, 7, 12, 15, 17, 19, 31, 41, 42, 44, 47, 49, 50, y 54 crecieron hasta el tercer repique, realizados cada 48 horas. Es de hacer notar que el crecimiento del clon 17 (Figura 5-3) fue muy superior a los demás clones.

Tabla 13-3: Evaluación del crecimiento de los clones en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con tolueno como única fuente de carbono

GRUPO	MUESTRA	CLON	TOLUENO (1 % v/v)		
			Repique 1	Repique 2	Repique 3
1	SC1	1	2	1	1
		2	1	1	1
		3	1	1	1
		4	1	0	0
	SC2	7	1	1	1
		8	2	0	0
		9	1	0	0
	SDC1	12	2	1	1
		13	1	1	0
		14	1	0	0
	SDC2	19	1	1	1
		20	1	0	0
		21	1	1	0
		22	1	0	0
		24	1	0	0
	SNC1	41	1	1	1
		42	1	1	1
		44	5	1	1
		46	1	0	0
	SNC2	49	1	1	1
50		2	1	1	
51		2	0	0	
52		5	0	0	

2	SC1	5	2	2	2
	SC2	10	1	0	0
		11	1	0	0
	SDC1	15	1	1	2
		17	4	4	5
		18	1	0	0
	SDC2	27	1	0	0
		28	1	1	0
		29	1	0	0
		30	1	0	0
		31	2	1	3
		32	1	0	0
		33	1	0	0
		35	1	0	0
		37	1	0	0
	38	1	0	0	
	SNC1	47	2	2	3
		48	1	0	0
	SNC2	54	3	1	1
		55	1	0	0
56		1	0	0	
57		1	0	0	

Los repiques se realizaron cada 48 horas. 0: sin crecimiento. 1: 0,1cm. 2: 0,2 cm. 3: 0,3cm. 4: 0,5 cm. 5: ≥ 1 cm

Realizado por: Moreno, Doris; 2019.

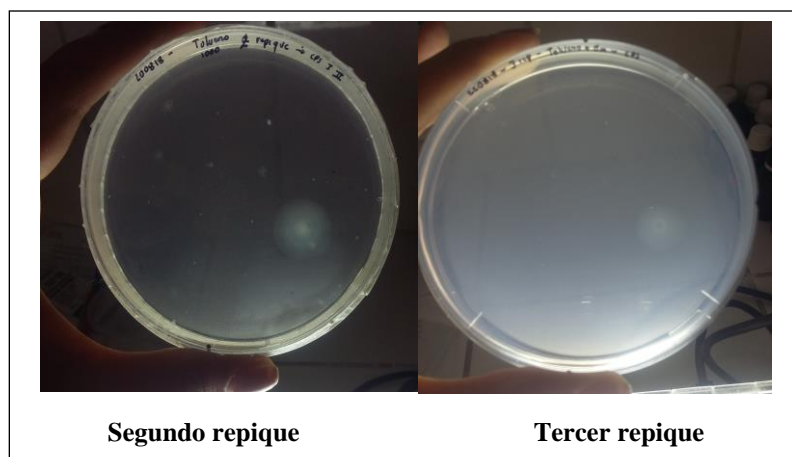


Figura 5-3: Crecimiento de los clones (grupo 2) en medio Bushnell-Haas suplementado con tolueno

Realizado por: Moreno, Doris; 2019.

3.3.10 Evaluación del crecimiento de los clones en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con fenol.

Mediante la evaluación para determinar los clones capaces de crecer en presencia de fenol (1 % v/v) como única fuente de carbono y energía utilizando medio Bushnell-Haas, se observa que de los 57 clones, 11 fueron capaces de crecer hasta el tercer repique, siendo estos los clones 2, 3, 12, 21, 44, 52, 5, 17, 31, 47 y 54 (Tabla 14-3). Cabe mencionar que el clon 17 presento mayor tamaño que el resto (Figura 6-3).

Tabla 14-3: Evaluación del crecimiento de los clones en medio mínimo Bushnell-Haas suplementado con fenol como única fuente de carbono

GRUPO	MUESTRA	CLON	FENOL (1 % v/v)		
			Repique 1	Repique 2	Repique 3
1	SC1	2	1	1	1
		3	1	1	1
	SC2	7	1	0	0
		8	1	0	0
		9	1	0	0
	SDC1	12	1	1	1
		13	1	0	0
		14	1	0	0
	SDC2	19	2	1	0
		20	1	1	0
		21	1	1	1
		22	1	0	0
		24	1	0	0
	SNC1	41	1	1	0
		42	1	1	0
		43	1	0	0
		44	5	3	1
		45	1	0	0
		46	1	1	0
	SNC2	49	1	0	0
50		2	1	0	
51		2	0	0	
52		5	3	1	
2	SC1	5	2	1	3

SC2	10	1	0	0
	11	1	0	0
SDC1	15	1	0	0
	16	1	0	0
	17	4	4	5
	18	1	0	0
SDC2	27	1	0	0
	28	1	0	0
	29	1	0	0
	31	1	1	3
	32	1	0	0
	33	1	0	0
	34	1	0	0
	35	1	0	0
SNC1	47	1	1	3
	48	1	0	0
SNC2	54	2	1	1
	55	1	0	0
	56	1	0	0
	57	1	0	0

Los repiques se realizaron cada 48 horas. 0: sin crecimiento. 1: 0,1cm. 2: 0,2 cm. 3: 0,3cm. 4: 0,5 cm. 5: ≥ 1 cm

Realizado por: Moreno, Doris; 2019

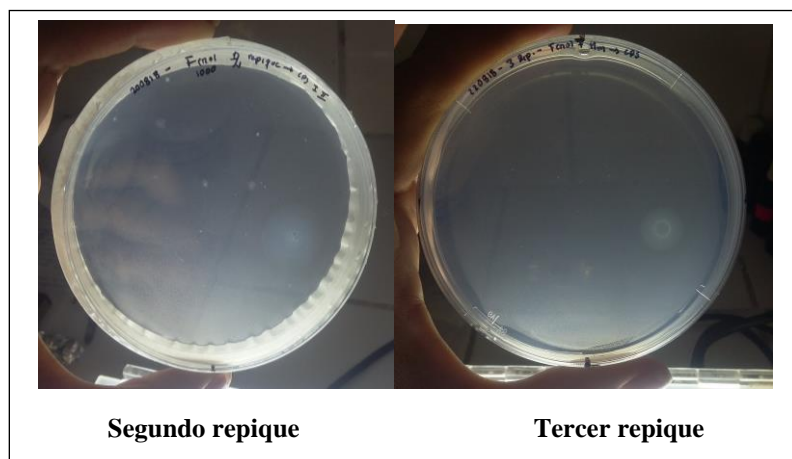


Figura 6-3: Crecimiento de los clones (grupo 2) en medio Bushnell-Haas suplementado con fenol.

Realizado por: Moreno, Doris; 2019.

Considerando el 100 % al total de clones seleccionados de cada muestra de suelo se determinó el porcentaje de las UFC de cada muestra que tuvieron un crecimiento igual o superior a 3 a una concentración de 1 % v/v de diésel, petróleo, benceno, tolueno y fenol como única fuente de carbono (Gráfico 10-3).

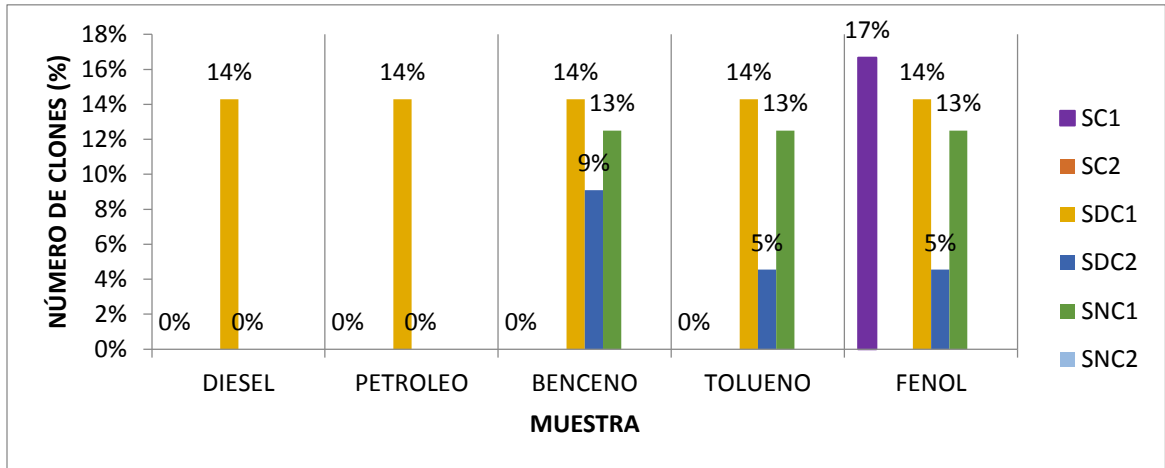


Gráfico 10-3: Número de clones del suelo contaminado y del suelo no contaminado en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con: diésel, petróleo, benceno, tolueno y fenol como única fuente de carbono.

Realizado por: Moreno, Doris; 2019.

La selección de bacterias a través de varios repiques sobre concentraciones de contaminantes como única fuente de carbono, es una estrategia eficiente para evaluar la adaptación y sobrevivencia de cepas con capacidad de metabolizar dichos contaminantes. Los resultados de las pruebas en laboratorio respaldan dicha estrategia de selección.

Los resultados obtenidos muestran que los clones del suelo contaminado (SC) fueron capaces de crecer en presencia de diésel, petróleo, benceno, tolueno y fenol como única fuente de carbono, mientras que del suelo no contaminado los clones aislados solo fueron capaces de crecer sobre benceno, tolueno y fenol como única fuente de carbono (Gráfico 10-3).

El clon 17 se destaca entre todos los clones aislados, por mostrar el mayor crecimiento (5) en los tres repiques realizados sobre todos los hidrocarburos utilizados como presión selectiva (diésel, petróleo, benceno, tolueno y fenol), este representa el 14 % del total de clones obtenidos de la muestra SDC1, aislado a partir de diésel como método de selección (grupo 2)

Santos et al, aislaron también de un suelo contaminado con petróleo cepas bacterianas capaces de utilizar diésel comercial como única fuente de carbono, afirmando también que estas cepas,

podrían ser utilizadas en procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos (Santos, et al., s.f.). Así mismo en Medellín, para el aislamiento de los microorganismos hidrocarbonoclastas utilizaron medio mínimo suplementado con el 1 % v/v de diésel (Arrieta, et al., 2012), lo que concuerda con este estudio, demostrándose que el crecimiento de ciertos clones bacterianos es mejor en medio mínimo que en medio PCA ya que el clon 17; pese a haber tenido condiciones similares de siembra e incubación presentó menor crecimiento sobre medio PCA.

En un estudio realizado por (Nisperuza, et al., 2010), se aislaron microorganismo de suelo contaminado con petróleo y de una zona sin contaminación visible de petróleo, al igual que en este estudio la capacidad de crecimiento se evaluó sobre medio mínimo con petróleo como única fuente de carbono, de la prueba de resistencia obtuvieron 9 cepas que registraron crecimiento al 12% de petróleo, mientras que en este estudio se aislaron 5 con capacidad de crecer en petróleo como única fuente de carbono a una concentración de 1 % v/v.

El benceno y tolueno son compuestos pertenecientes a los llamados BTEX (benceno, tolueno, xileno y etilbenceno), los cuales según las pruebas metabólicas pueden ser usados como fuente de carbono por microorganismos aislados mayormente de suelos contaminados con petróleo. En el presente estudio el clon 17 proveniente de suelo contaminado con petróleo presentó características de crecimiento que lo hacen candidato para ser utilizado en procesos de biorremediación de ambientes contaminados por ejemplo con benceno o tolueno que según pruebas al estar estos mezclados, el tolueno es el compuesto que se degrada antes que el benceno (Franzmann et al., 2002).(Nisperuza, et al., 2010). Relativamente los BTEX son muy solubles comparados con otros contaminantes y pueden servir como donadores primarios de electrones para muchos microorganismos, por estas razones son relativamente fáciles de biodegradar (Diaz, et al., 2013, p. 55). Sería importante realizar una evaluación más amplia de este clon para determinar su capacidad de crecimiento en medios suplementados con xileno y etilbenceno.

Los clones que presentaron crecimiento sobre AC y ASL como única fuente de carbono fueron aislados en condiciones aerobias, razón positiva para definirlos como degradadores de BTEX ya que según (Nacional Research Council, 1993, citado en (Diaz, et al., 2013, p. 55) y (Pérez, et al., 2015, pp. 25-27) Los microorganismos que degradan BTEX crecen rápidamente si hay suficiente cantidad de oxígeno disponible

Dado que el carbono es el principal nutriente para el crecimiento bacteriano (Windevoxhel, et al., 2009), sobre medio mínimo, suplementado con diésel, petróleo, benceno, tolueno o fenol como única fuente de carbono asegura que solo los microorganismos con capacidad de asimilar el carbono de estos contaminantes necesariamente lo estarían metabolizando.

CONCLUSIONES.

En este estudio se encontró, a diferencia de lo esperado, que el mayor número de bacterias estaba presente en el suelo contaminado (333.625 UFC/g) en comparación con el suelo no contaminado (246.375 UFC/g); se podría suponer, de acuerdo a referencias bibliográficas que esto se debe a que el efecto de la presión selectiva aunque disminuye la diversidad de la microbiota del suelo, favorece el incremento de las poblaciones bacterianas más tolerantes.

A partir de medio sólido Plate Count Agar (PCA) se aislaron 17 clones provenientes del suelo contaminado y 13 del suelo no contaminado, y a partir del mismo medio suplementado con diésel se aislaron 24 clones del suelo contaminado y 6 del suelo no contaminado, para un total de 60 clones de los cuales se consiguió estabilizar 57.

La evaluación del nivel de tolerancia de los clones ante diferentes presiones selectivas mostró que cuatro de los clones (14-SDC1, 16-SDC2, 44-SNC1, 52-SNC2) toleraron diésel hasta una concentración de 4 mL/100 mL de medio PCA y cinco clones (8-SC2, 16-SDC1, 44-SNC1, 51 y 52-SNC2) toleraron la misma concentración de petróleo; presentando un crecimiento ≥ 1 cm de diámetro. Cuatro clones (14,17-SDC1, 20,23-SDC2), presentaron un crecimiento de 3 mm, ante una concentración de 1000 ppm de ácido sulfónico lineal, de los cuales uno (14-SDC1) toleró 500 ppm de amonio cuaternario.

La evaluación del crecimiento de los 57 clones aislados, en medio agarizado Bushnell-Haas suplementado con diésel, petróleo, benceno, tolueno y fenol (1mL/100mL) mostro un crecimiento variado, haciéndose notar el clon 17 proveniente del suelo contaminado (SDC1), el cual presentó mayor crecimiento en presencia de todos los contaminantes en tres repiques.

RECOMENDACIONES.

Se recomienda realizar la identificación bioquímica y molecular de los clones con mayor tolerancia a las presiones selectivas usadas durante la investigación.

Debido al potencial de degradación mostrado por algunos de los clones estudiados, se recomienda evaluar el porcentaje de degradación de otros contaminantes.

Los clones tolerantes a benceno y tolueno podrían ser aptos para usarlos en biofiltros para eliminar estos elementos contaminantes, por ello se recomienda continuar su estudio en procesos de degradación de BTEX.

Se recomienda realizar estudios en procesos de biorremediación a partir de consorcios con los clones que presentaron mayor tolerancia, en lugar de cultivos puros.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Albert, L.** *Contaminación ambiental: origen, clases, fuentes y efectos* [en línea]. México: Sociedad Mexicana de toxicología, 2004. [Consulta: 20 noviembre 2018]. Disponible en: <http://www.bvsde.ops-oms.org/bvstox/fulltext/toxico/toxico-01a4.pdf>
2. **Allaert, C., & Escolá, M.** *Métodos de análisis microbiológicos de alimentos*. [en línea]. 1ª ed. Madrid-España: Díaz de Santos, 2002. [Consulta: 11 noviembre 2018]. Disponible en: : https://books.google.com.ec/books?id=_H9PkmwKdZ0C&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
3. **Arrieta et al, O.** " Biorremediación de un suelo con diesel". *Gestión y ambiente*, vol. 5, n° 1 (2012) pp. 27-40.
4. **Atilio, E.** *Contaminación*. [en línea]. Catamarca: Universidad Nacional de Catamarca, 2007. [Consulta: 25 octubre 2018]. Disponible en: https://www.um.es/sabio/docs-cmsweb/materias-may25-45/tema_6.pdf
5. **Atlas, R.** *Microbiological Media* [en línea]. 3ª ed. Londos-New York: CRC PRESS, 2004. [Consulta: 11 noviembre 2018]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=aWsF-e8tPzIC&pg=PA273&lpg=PA273&dq=Bushnell-Haas+Broth&source=bl&ots=9HBMddP5Rl&sig=ACfU3U35QUAjSxcSZTBchvc65xvyT2Gcg&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwiJwNbjkZfgAhUCbK0KHYYvaDck4FBDoATAlegQIBBAB#v=onepage&q=Bushnell-Haas%20Broth&>
6. **Báez, O.** *Impacto de la actividad petrolera en los ecosistemas amazónicos* [en línea]. Ecuador: 2013. [Consulta: 04 abril 2018]. Disponible en: <http://ecuadorlibrerred.tk/ambiente/4165-2013-11-26-17-23-43>
7. **Becerra et al, S.** "Vivir con la contaminación petrolera en el ecuador: percepciones sociales del riesgo". *Dielnit*, vol. 23. n° 23 (2013) pp. 102-120.
8. **Benavides et al, J.** " Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo". *NOVA*, vol. 4, n° (2006) , pp. 1-9.
9. **Beristain et al, C.** *Las palabras de la selva* Ecuador: Bilbao: Instituto de Estudios sobre Desarrollo y Cooperacion Internacional, 2009, pp. 1-250

10. **Bermúdez, M.** *Contaminación y turismo soatenible* [en línea]. 2010. [Consulta: 18 octubre 2018]. Disponible en: <http://galeon.com/mauriciobermudez/contaminacion.pdf>
11. **Botello et al, A.** *Contaminación e impacto ambiental: Obtenido de Características, Composición y Propiedades físicoquímicas del petróleo*. [en línea]. 2ª ed. Golfo de Mexico: Centro EPOMEX. Universidad Autónoma de Campeche, 2005. [Consulta: 22 octubre 2018]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Maricusa_Agraz/publication/280446339_Diagnostico_del_Impacto_y_Lineamientos_Basicos_para_los_Programas_de_Mitigacion_y_Manejo_de_Humedales/links/55b556b108aec0e5f436a96c/Diagnostico-del-Impacto-y-Lineamientos-Basicos-p
12. **Bravo, E.** *Los impactos de la explotación petrolera en ecosistemas tropicales y la biodiversidad*. [en línea]. 2007. [Consulta: 12 mayo 2018]. Disponible en: https://www.inredh.org/archivos/documentos_ambiental/impactos_explotacion_petrolera_es_p.pdf
13. **Buendía, R.** " Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante el compost de aserrín y estiércol". *UNMSM* , vol. 11, n° 30 (2012) pp. 123-130.
14. **Cazorla, O; Gator, M.** *Los daños por los que la petrolera Chevron no ha indemnizado a sus víctimas en Ecuador* [en línea]. Ecuador: 2015. [Consulta: 22 abril 2018]. Disponible en: <https://www.opendemocracy.net/democraciaabierta/orlan-cazorla-miriam-gator/los-da%C3%B1os-por-los-que-la-petrolera-chevron-no-ha-indem>
15. **CONUEE.** *Derivados del petróleo: diésel* [en línea]. Movilidad y Transporte, 2017. [Consulta: 21 noviembre 2018]. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/241728/DieselFT.pdf>
16. **Díaz, Laugene, B., & Beltran.** " Biodegradación de Keroseno por cultivo de bacterias aisladas de una fosa petrolera en Venezuela". *URU*, n° 4 (2013) pp. 51-59.
17. **Díaz, R.** *Metodologías de muestreo de suelos, análisis químico de suelos y tejido vegetal y de investigaciones en invernadero* [en línea]. Costa Rica: CATIE. 1978. [Consulta: 23 diciembre 2018]. Disponible en: http://www.sidalc.net/repdoc/A6790e/A6790e.pdf?fbclid=IwAR0VrC727Bw2e3Gq4DaOERTJtbftui-zUki-PJbCYt0Ekr86u1Io-o_ZS1I
18. **Díaz et al, R..** " Biodegradación de fenol en aguas tratadas de la industria petrolera para re- uso en cultivos agrícolas". *Biología tropical*, vol. 65, n° 2 (2016) pp. 685-699.

19. **Escalante, A., Lagarda, G., Martínez, A., & Bolívar, F.** " Diversidad bacteriana del suelo: metodos de estudio no dependientes del cultivo microbiana e implicaciones biotecnológicas". *Sistema de Información Científica*, vol. 38, n° 16 (2004) pp. 583-592.
20. **Funes, N; Pérez, C.** " La huella tóxica de Texaco en Ecuador". *Ecologistas en acción*, n° 89 (2016), (Ecuador) pp. 1-68.
21. **Hernández, L.** Aislamiento y caracterización de una bacteria hidrocarbonoclástica de la región de valparaíso y su aplicación en biorremediación de hidrocarburos [en línea] (tesis) Universidad Técnica Federico Santa María, Ingeniería química y ambiental. Valparaíso-Chile. 2018.pp. 1-61. [Consulta: 23 diciembre 2018]. Disponible en: <https://repositorio.usm.cl/bitstream/handle/11673/43374/3560900255036UTFSM.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
22. **Lesser, J., & Susana, S.** *Principales hidrocarburos contaminantes del suelo y acuíferos* [en línea]. México: UNM, 2001. [Consulta: 24 octubre 2018]. Disponible en: <http://www.lesser.com.mx/files/01-1-Principales-hidrocarburos-contaminantes-de-suelos-y-acuíferos.pdf>
23. **López et al, H.** *Técnicas de identificación* [en línea]. Francisco Javier Castillo, 2015 Microbiología aplicada al paciente crítico. [consulta: 13 noviembre 2018]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Francisco_Castillo4/publication/266052838_Tecnicas_de_identificacion/links/54afb1780cf2b48e8ed683ba/Tecnicas-de-identificacion.pdf
24. **López et al, L.** " Las tinciones básicas en el laboratorio". *Investigación en Discapaidad* , vol. 3, n° 1 (2014) pp. 10-18.
25. **Martín, C., González, A., & Blanco, M. J.** " Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación". *Iberoamericana de Micología*, vol. 21 (2004) (España) pp. 103-120.
26. Microbiología general. *Cultivos de bacterias* [en línea]. 2017. [Consulta: 12 octubre 2018]. Disponible en: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/microgeneral/wp-content/uploads/2017/02/04-CULTIVO-DE-BACTERIAS.pdf>
27. **Ministerio de energía.** *Refinación y derivados del petróleo*. [en línea]. Chile: 3013. [Consulta: 21 noviembre 2018]. Disponible en: <http://www.aprendeconenergia.cl/refinacion-y-derivados-del-petroleo/>
28. **Ministerio de Relaciones Exteriores y Movilidad Humana.** [en línea]. Ecuador: 2015. El caso Chevron / Texaco en Ecuador Una lucha por la justicia ambiental y social. [Consulta:

16 octubre 2018]. Disponible en: <https://www.cancilleria.gob.ec/wp-content/uploads/2015/06/Expediente-Caso-Chevron-abril-2015.pdf>

29. **Montaner, L.** *Diversidad microbiológica de bacterias y hongos en suelos impactados con desechos urbanos*. [en línea]. Venezuela: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo, 2011. [Consulta: 10 junio 2018]. Disponible en: <http://mriuc.bc.uc.edu.ve/handle/123456789/2760>.
30. **Nisperuza, Ana, M., & Montiel.** Caracterización y evaluación de cepas bacterianas nativas con capacidad hidrocarburofítica del pozo petrolero de San Sebastián, Lorica, departamento de Córdoba (tesis) (pre-grado). [en línea] Universidad de Córdoba, Facultad de ciencias de la salud, Bacteriología Montería. (Córdoba-Argentina). 2010. pp. 1-58. [Consulta: 2018-12-10]. Disponible en: <http://repositorio.unicordoba.edu.co/bitstream/handle/123456789/969/CARACTERIZACION%20DE%20BACTERIAS%20NATIVAS%20HIDROCARBUROL%20C3%8DTIC%20AS.pdf?sequence=1>
31. **Nogales, B.** " La microbiología del suelo en la era de la biología molecular". *Ecosistemas*, vol. 14. n° 2 (2005), pp. 41-50.
32. **Olguín et al, E.** " Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclastico de hongos aislados de crudo" *RELBA* , vol. 3, n° 1 (2012) pp. 5-99.
33. **Oropeza, J.** Diversidad microbiológica de bacterias y hongos en suelos impactados con petróleo, provenientes de Yaracal, estado Falcón Venezuela [en línea] (tesis) Universidad de Carabobo, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Química. Venezuela. 2010. pp. 1-84. [Consulta: 17 noviembre 2018]. Disponible en: <http://riuc.bc.uc.edu.ve/bitstream/123456789/2818/3/joropeza.pdf>
34. **Ortíz, Oscar, I., Irina, G., & Arturo.** " La restauracion de suelos contaminados". *Gaceta Eológica*, n° 69 (2003) pp. 83-92.
35. **Pacheco, E., Villegas, M., Pérez, M., & Corral, V.** *El petróleo* [en línea]. [Consulta: 20 octubre 2018]. Disponible en: <http://platea.pntic.mec.es/~rmartini/petroleo.htm>
36. **Peñaloza, J.** " Contaminación". *Desarrollo Local Sostenible DELOS*, vol. 5, n° 13 (2012). pp. 1-15
37. **Pérez, S., Silva, I., Peñuela, G., & Cardona, S.** "Evaluación de biocombustibles e hidrocarburos del petróleo (gasolina y diésel) en un suelo: proceso de transporte y biorremediación". *EIA*, vol. 12 n°. 02 (2015), pp. 21-46.
38. **Pinos, R.** *Petroquímica-el petróleo*. Riobamba Ecuador: 2008, pp. 21-40.

39. **Portugal, O., & Aguilera, G.** " Microorganismos y biodiversidad". *TERRA Latinoamericana*, vol. 16, n° 3 (1998) pp. 289-292.
40. **Rivera et al, M.** " Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo". *TERRA Latinoamerica*, vol. 20, n° 4 (2002), (México) pp. 423-434.
41. **Roberts, T.** "El muestreo de suelos: los beneficios de un buen trabajo". *Informaciones agronómicas*, n° 42(2000) pp. 4-13.
42. **Rodríguez, E; Gamboa, M., Hernández, F., & García, J.** *Bacteriología general: principios y prácticas del laboratorio* [en línea] Cost Rica: Universidad de Costa Rica, 2006. [Consulta 20 junio 2018]. Disponible en: https://books.google.es/books?id=vwB0fgirgN0C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
43. **Santos et al, M.** *Aislamiento, identificación y cinética de microorganismos degradadores de hidrocarburos del petróleo, nativos de un suelo minero.* [en línea]. España: Instituto Tecnológico de Durango, (s.f.). XI Congreso nacional de biotecnología y bioingeniería. [Consulta: 04 enero 2019]. Disponible en: https://smbb.mx/congresos%20smbb/merida05/TRABAJOS/AREA_IV/CIV-51.pdf
44. **Torres, K., & Zuluaga, T.** Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica (Tesis)[en línea]. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de minas, Ingeniería química. (Medellín-Colombia). 2009. pp. 1-92. [Consulta: 2018-05-12]. Disponible en: http://www.bdigital.unal.edu.co/815/1/32242005_2009.pdf
45. **Valderrama, B.** *Microbiología del petróleo y sus derivados* [en línea]. Mexico: D. E. Romero, 2000. [Consulta: 02 junio 2018]. Disponible en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/index.html>
46. **Vargas, P., Cuéllar, R., & Dussán, J.** " Biorremediación de residuos de petróleo". *Apuntes científicos unandinos.* [en línea]. 2004, (4), pp. 42-49. [Consulta: 25 febrero 2018]. Disponible en: <http://hipotesis.uniandes.edu.co/hipotesis/images/stories/ed04pdf/Biorremediacion.pdf>
47. **Vargas, Tatiana, K., & Alvin.** " Morfología bacteriana". *Actualización clínica*, vol. 49, n° 2 (2014) pp. 2594-2598.
48. **Vazques, J.** *Aislamiento de microorganismos cultivables del suelo rizosférico de plantas de café* [en línea]. Venezuela: Universidad Nacional experimental del Táchira, 2016.

[Consulta: 25 febrero 2018]. Disponible en:
<https://es.slideshare.net/josevazquez7503/aislamiento-de-microorganismos-cultivables-del-suelo-rizosfrico-de-plantas-de-caf-coffee-arabica-l>

49. **Vázquez et al, C.** "Técnicas básicas de Microbiología". *REDUCA*, vol. 3, n° 5 (2010) pp. 15-38.
50. **Windevoxhel et al, R.** " Caracterización de la comunidad bacteriana de un Ripio de perforación y aislamiento de un consorcio bacteriano con capacidad hidrocarburoclástica". *Revista ingeniería UC*. vol. 16, n° 2 (2009) (Venezuela) pp. 14-19

ANEXOS

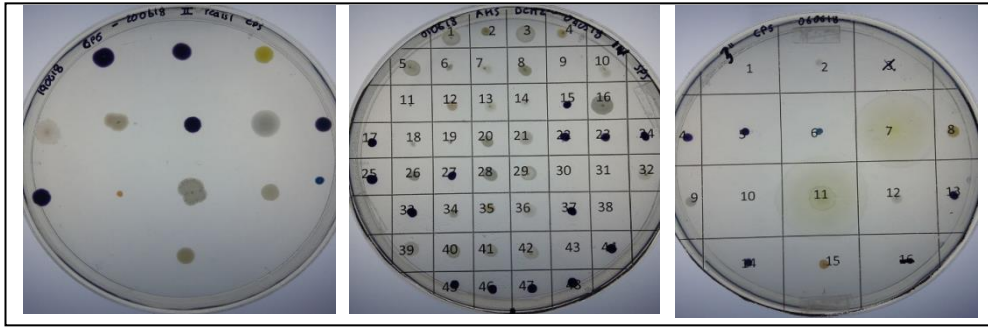
Anexo A: Recolección de muestras.



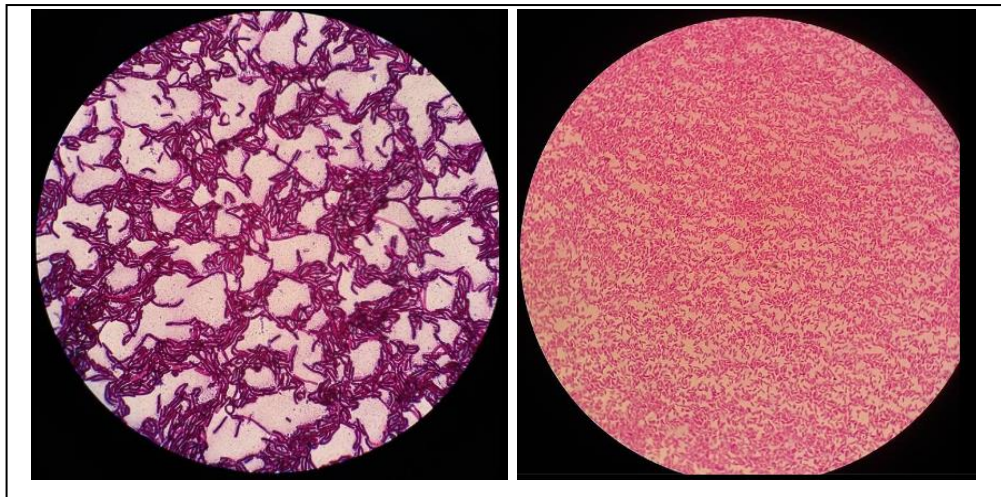
Anexo B: Proceso de siembra y estimación de unidades formadoras de colonias de las muestras.



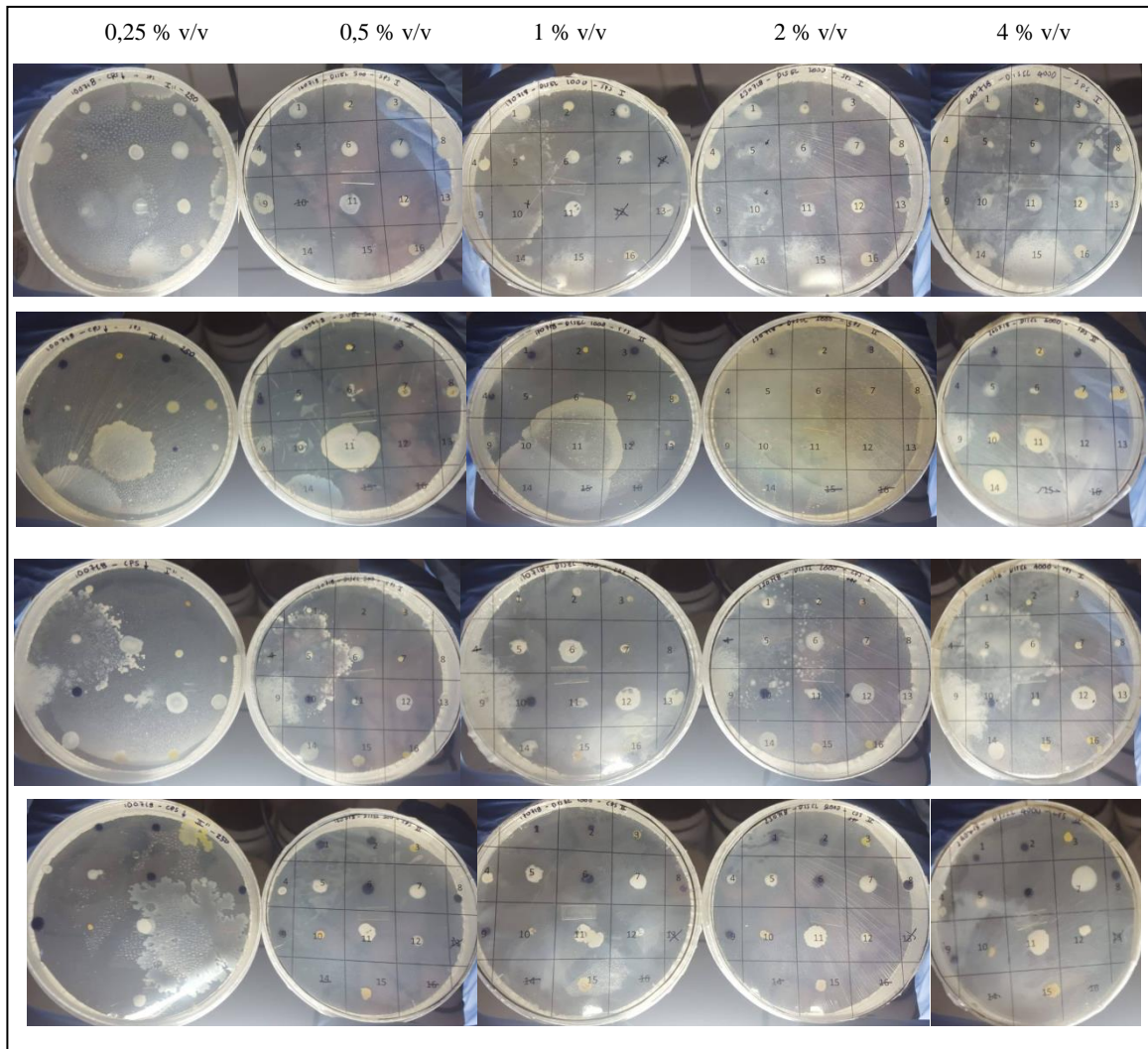
Anexo C: Selección de aislados bacterianos



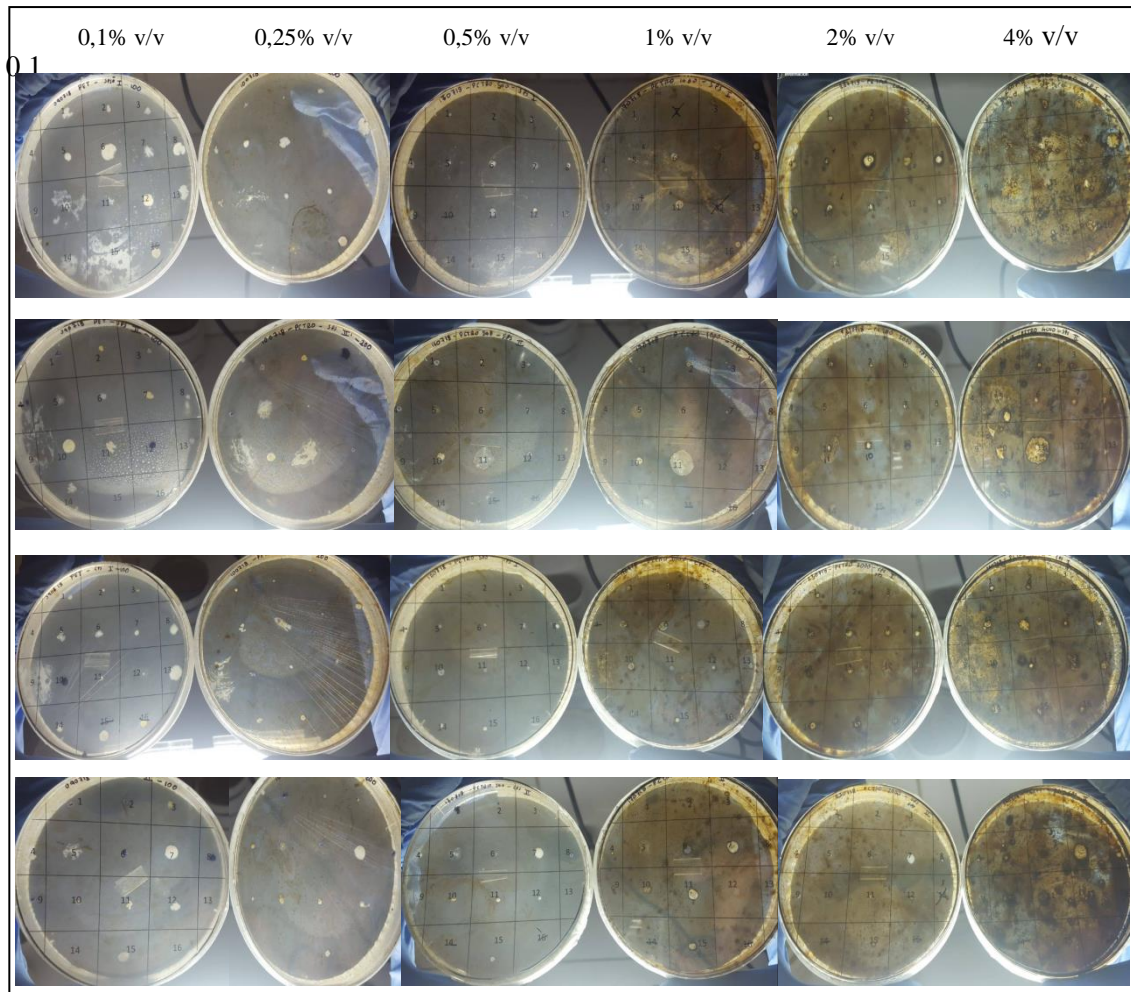
Anexo D: Micromorfología de los clones bacterianos seleccionados.



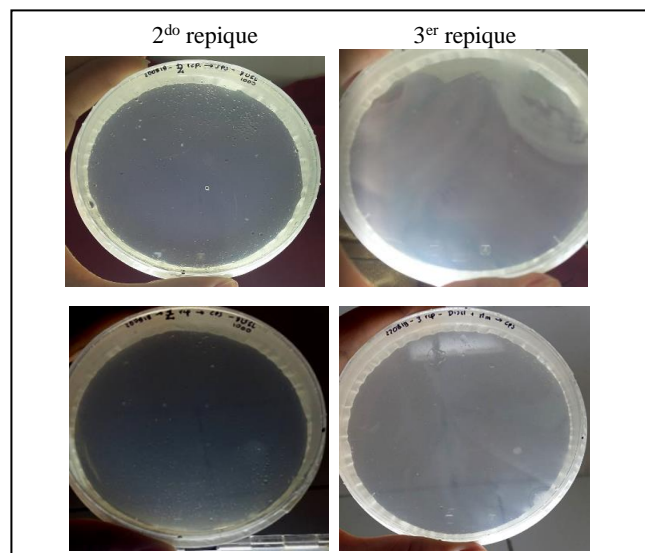
Anexo E: Evaluación de la tolerancia de los clones a concentraciones crecientes de diésel.



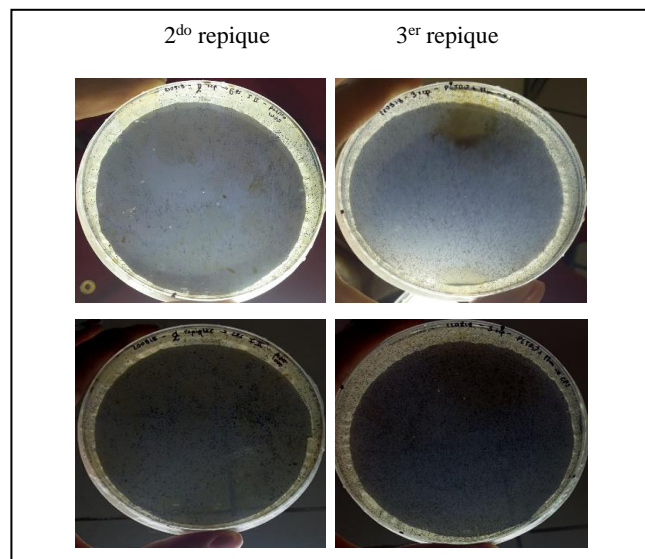
Anexo F: Evaluación de la tolerancia de los clones a concentraciones crecientes de petróleo.



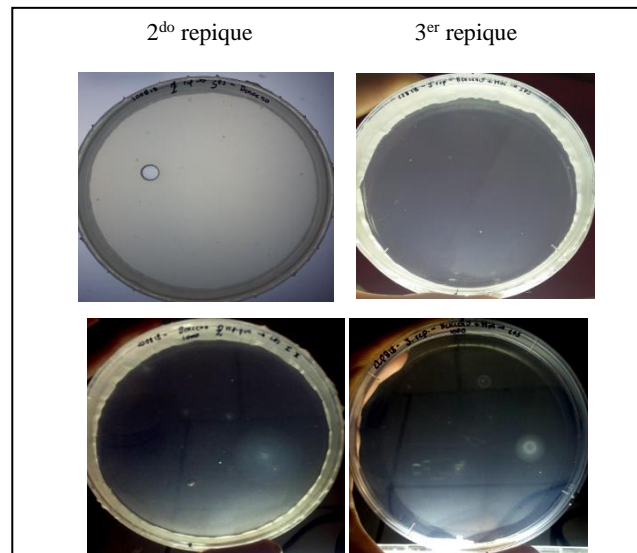
Anexo G: Crecimiento de los clones en medio mínimo Bushnell-Haas suplementado con diésel.



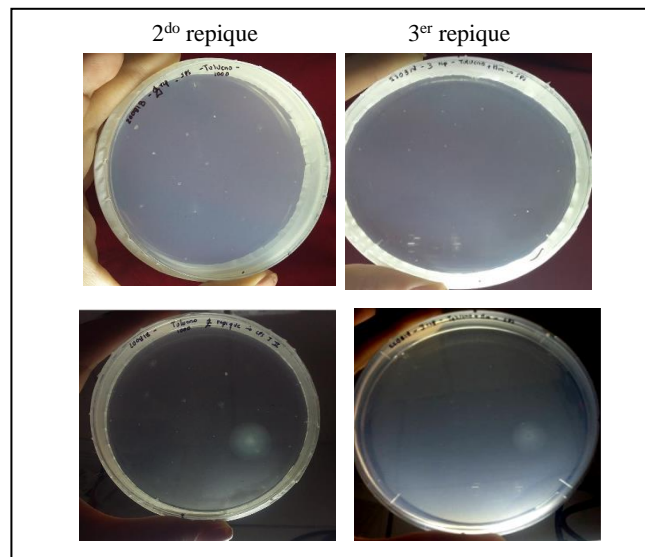
Anexo H: Crecimiento de los clones en medio mínimo Bushnell-Haas suplementado con petróleo.



Anexo I: Crecimiento de los clones en medio mínimo Bushnell-Haas suplementado con benceno.



Anexo J: Crecimiento de los clones en medio mínimo Bushnell-Haas suplementado con tolueno.



Anexo K: Crecimiento de los clones en medio mínimo Bushnell-Haas suplementado con fenol.

